تقييم السائل المنوي المجمد في أوساط مختلفة عند كباش العواس باستخدام جهاز الـ CASA

Evaluation of Frozen Semen in Different Extenders for Awassi Rams Using CASA System

د. محمد موسى[1-4] م. رامي خلوف[1] أ.د محمد ربيع المرستاني[1-2] أ.د عبد الوالي الأغبري[1] ط.ب رسلان أبورومية[3]

M. Moussa R. khlouf M R. Al-Merestani A. Alaghbari R. Abo Roumia

(1) إدارة الثروة الحيوانية، المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (أكساد) ، دمشق، سورية.

(1-2) قسم الإنتاج الحيواني، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

(3) المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (أكساد) ، محطة بحوث ازرع، سورية.

(4) كلية الطب البيطري، حماة، سورية.

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى اختبار فعالية محاليل التمديد محلية الصنع لحفظ السائل المنوي بالتجميد عند ذكور أغنام العواس. جمع السائل المنوي من ثلاثة ذكور بطريقة المهبل الإصطناعي مرة أسبوعياً من كل كبش، بمعدل قذفتين في كل مرة ولمدة ثلاثة أشهر، مُدد السائل المنوي بمحلولين محلّيّ الصنع (سترات الصوديوم مع صفار البيض، والحليب خالي الدسم)، ومحلول تجاري (Andromed®) الذي استخدم كشاهد. تم تعبئة القشات بالسائل المنوي الممدد ثم جُمدت أليا، وفُحصت القشات المجمدة باستخدام جهاز CASA. أظهرت النتائج وجود فرق معنوي ($P<0.001$) في الحركية (MOT) والحركة التقدمية الأمامية (PROG) بعد الإذابة بين محاليل التمديد الثلاثة وكانت أعلى قيمة للحركية في محلول الشاهد حيث بلغت بالمتوسط 63.42±1.13، وأقل قيمة في محلول تمديد الحليب (31.76 ± 1.99)، أما في محلول السترات فبلغت 50.93 ± 1.64، وكانت الحركة التقدمية الأمامية (47.71 ± 1.99، 33.25 ± 2.63، و21.19 ± 1.89) للأندروميد والسترات والحليب على التوالي، ووصلت خطية المسار (LIN) إلى 45، 49، و 58 % للأندروميد والسترات والحليب على التوالي. ومعدل مسافة المسار (DAP) 21.32±0.53، 19.74±0.70 و 16.06±0.61 للأندروميد والسترات والحليب على التوالي، ووصل معدل مسافة الخط المستقيم (DSL) إلى 15.61±0.32، 15.39±0.50، و12.95±0.43 للأندروميد والسترات والحليب على التوالي، ومعدل مسافة الخط المنحني (DCL) 34.73±0.99، 31.32±1.29، 22.88±1.23 للأندروميد والسترات والحليب على التوالي، وأما معدل سرعة المسار (VAP) فبلغت في محلول الأندروميد 52.41±1.33، و 40.56±1.59 في محلول الحليب و 46.97±1.70 في محلول السترات، وسرعة الخط المستقيم (VSL) 38.5±0.81، 36.7±1.20، و 32.9±1.16 للأندروميد، والسترات، والحليب على التوالي، وبلغت سرعة الخط المنحني (VCL) 84.70±2.46، 74.13±3.1، و 57.29±3.00 للأندروميد، والسترات، والحليب على التوالي، كذلك بلغت قدرة سعة الإزاحة الجانبية للرأس (ALH) 6.18±0.13، 5.64±0.16 و 4.80±0.21 للأندروميد، والسترات، والحليب على التوالي. يستنتج من هذه الدراسة أن محلول سترات الصوديوم مع صفار البيض المصنع محلياً يضاهي المحلول التجاري في تمديد السائل المنوي المجمد لكباش العواس.

الكلمات المفتاحية: تقييم، السائل المنوي، محاليل التمديد، جهاز CASA، كباش العواس.

©2015 The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry Lands, All rights reserved.

ISSN:2305 - 5243

Abstract

The aim of this study was to determine the efficiency of local extenders in cryopreservation of semen Awassi rams. The semen was collected from three rams by an artificial vagina method twice/ per day per week for 3 months. This semen was diluted with three extenders (Sodium Citrate with Egg Yolk, EYC and Skimmed Milk, SM) and Andromed® as a control diluent. The straws were filled by semen diluted and frozen automatically; the frozen straws were examined under CASA system. The results showed that there was significant difference (P<0.001) in the rates of motility (MOT) and progressive (PROG), The rates were 63.42±1.13, 50.93±1.64, 31.76± 1.99, and 33.25± 2.63, 21.19±1.89% in the Andromed®, EYC and SM, respectively, and LIN was 45, 49, 58% in the Andromed®, EYC and SM respectively. Distance Average Path (DAP) were 21.3±0.53, 19.74±0.70, and 16.06±0.61 in the Andromed®, EYC and SM respectively, and Distance Straight Lin (DSL) were 15.61±0.32, 15.39±0.50, and 12.95±0.43 respectively, Distance Curved Lin (DCL) were 34.73±0.99, 31.32±1.29, and 22.88±1.23 respectively. Also Velocity Average Path (VAP) were 52.41±1.33, 46.97±1.70, and 40.56±1.59 in the Andromed®, EYC and SM respectively, and Straight Lin Velocity (VSL) were 38.5±0.81, 36.7±1.20, and 32.9±1.16 respectively, also Curved Lin Velocity (VCL) were 84.70±2.46, 74.13±3.1, and 57.29±3.00 respectively. Lateral Head Displacement (ALH) were 6.18±0.13, 5.64±0.16, and 4.80±0.21 in the Andromed®, EYC and SM, respectively. It was concluded that EYC can be used as local extender to dilute the frozen semen of Awassi rams.

Key words: Evaluation, Semen, Diluents, CASA, Awassi rams.

المقدمة

تؤدي تقانة التلقيح الإصطناعي دوراً مهماً في التغلب على موسمية التناسل عند الأغنام (Laura وزملاؤه، 2005)، كما تسهم في نشر التراكيب الوراثية لذكور الأغنام المختبرة. إن تطوير محاليل تمديد محلية الصنع يسهم بشكل كبير في حفظ نطاف الكباش المحسنة والمختبرة، وتلقيح أكبر عدد ممكن من النعاج. وعلى الرغم من الصعوبات التي اعترضت استخدام تقانة التلقيح الاصطناعي في الأغنام، إلا أن تطبيقها يزداد سنوياً في العالم ليصل إلى3.1 % في عام 2002 (Colbjornsen، 2002). وبيّن زكريا وسلهب (1991) أنه لُقح اصطناعياً أكثر من (30) مليون رأس من النعاج في الإتحاد السوفيتي سنوياً، ويلقح في فرنسا، وأستراليا 350 و 400 ألف رأس من النعاج على التوالي. وأثار حفظ السائل المنوي اهتمام مربي الأغنام منذ بدايات التلقيح الإصطناعي (Salamon و Maxwell، 1995)، فكان لابد من توفير وسط مناسب لحفظ المادة الوراثية للنطفة، ويؤمن درجة حموضة وضغط أسموزي مناسبين، لذا استخدمت عدة ممددات لتخزين السائل المنوي في الأغنام، ولا يوجد حتى الآن ممدد قادر على تخزين السائل المنوي لأكثر من 2-3 أيام دون حدوث انخفاض في الخصوبة (Vishwanath و Shannon، 2000). وتوجد محاولات كثيرة لإنتاج وسط مناسب لتمديد السائل المنوي في الكباش (O،Hara وزملاؤه، 2010)، وقد مدد سائلها المنوي بممددات مختلفة (Paulenz وزملاؤه،2003)، تعتمد بشكل رئيس على الحليب أو صفار البيض (Christine، 2008). وجد أن محلول سترات الصوديوم مع صفار البيض يحافظ على نوعية السائل المنوي بعد الإذابة (Tekin، 1982). وقد استخدم صفار البيض بتراكيز مختلفة في محاليل تمديد السائل المنوي للكباش (Matsuoka وزملاؤه، 2006)، حيث استُعمل بتركيز 25–30 % (Abdel- Hakeam وزملاؤه، 1991)، و20 % (Tuli وزملاؤه، 1991)، و10 % (Mary وAbdel-Malak، 1994) و6 % (Graham وزملاؤه، 1978)، و3–6 % (Waston وMartin، 1975). وبين Garde وزملاؤه (2008) أن استعمال صفار البيض بتركيز 5 % والجليسيرول بتركيز 6 % أعطت نتائج أفضل مقارنة مع صفار البيض تركيز 20 %و جليسيرول بتركيز4 %.

يُستعمل محلول الحليب الخالي الدسم على نطاق واسع لتمديد نطاف الكباش (Salamon و Maxwell، 1995)، والماعز (Lebouef وزملاؤه، 2003). كما يُعد الممدد الرئيس الذي يُستخدم لحفظ السائل المنوي عند الكباش بدرجة حرارة 15مْ في دول البحر المتوسط (Yániz وزملاؤه، 2005). وقد أوصى العديد من الباحثين باختيار هذا النوع من الممددات في السويد (Lillo، 1984)، والنرويج (Paulenz وزملاؤه، 2003).

أما محلول Andromed® (Minitüb، GmbH، Tiefenbach، Germany) فيحتوي على فوسفوليبيدات، وتريس، وحمض الستريك، وفركتوز، ومانعات تأكسد، ومواد واقية، وغليسيرول، ومجموعة من الصادات الحيوية، ولا يحتوي صفار البيض أو أي مشتقات حيوانية (Nothling وزملاؤه، 2007). واستُعمل جهاز تحليل السائل المنوي بمساعدة الحاسوب الـ CASA بهدف التقييم الآلي الدقيق والموثوق للحركية والحركة التقدمية الأمامية، ومؤشرات الحركية الفردية للنطاف (Holt وزملاؤه، 2007; Kumar وزملاؤها، 2007)، وقد طُبق هذا التحليل على السائل المنوي للكباش لتقييمه بعد الحفظ لفترات قصيرة (Joshi وزملاؤه، 2003 ; Kasimanickam وزملاؤه،2007)، وطويلة الأمد (Bag وزملاؤه، 2002 ; Joshi وزملاؤه،

2006). وتُعد نطاف الكباش سريعة التأثر بالإجهادات المختلفة خلال عمليتي الحفظ بالتجميد (Salamon وMaxwell، 2000; Anel وزملاؤه، 2006)، والإذابة (Naqvi وزملاؤه، 2001). تعتمد النطاف في المحافظة على وظيفتها بعد عمليتي التجميد والإذابة على عدة عوامل مترابطة، تتضمن معدل التبريد، وفترة التأقلم، وطريقة التجميد (Bailey وزملاؤه، 2000 ; Curry، 2000 ; Anel وزملاؤه، 2006)، ومكونات محاليل التمديد المختلفة (Holt، 2000)، كل هذه العوامل يمكن أن تؤدي إلى تغيرات في طبيعة النطاف، كإنخفاض الحركية (Fair وزملاؤه، 2007)، والحيوية، وسلامة الأكروزومات (Salamon و Maxwell، 2000; Medeiros وزملاؤه، 2002).

تهدف هذه الدراسة إلى اختبار فعالية محاليل التمديد محلية الصنع (سترات الصوديوم مع صفار البيض، والحليب خالي الدسم) ومقارنتها مع محلول الأندروميد التجاري في حفظ السائل المنوي لفترات طويلة (بالتجميد) عند ذكور أغنام العواس من خلال تقييمها باستخدام جهاز التحليل الآلي للسائل المنوي (CASA).

مواد البحث وطرائقه

تحضير محاليل التمديد:

استُعملت ثلاثة محاليل لمداولة السائل المنوي وحفظه لفترات طويلة الأمد (بالتجميد)، اثنان منها محلي الصنع (سترات الصوديوم مع صفار البيض، والحليب الخالي من الدسم)، والثالث هو الأندروميد (المحلول التجاري الشاهد).

حُضر محلول سترات الصوديوم مع صفار البيض عن طريق إضافة 3.5 غ من السترات، و 0.194 غ غلوكوز إلى 100 مل ماء مضاعف التقطير، وحُرك المحلول حتى الذوبان الكامل، ثم سحب 20 مل من المحلول وأُضيف بدلاً منها 20 مل من صفار البيض الكامل مع استمرار التحريك، و 500 وحدة دولية/مل بنسلين.

أما بالنسبة لتحضير محلول الحليب الخالي من الدسم فقد سخن حليب البودرة الخالي من الدسم بعد حلّه بالماء على درجة 92-95 م°، وتُرك ليغلي مدة عشر دقائق، ثم بُرد لدرجة حرارة الغرفة وسُكب الحليب المبرد في وعاء معقم، وأُزيل الدسم المتبقي، أُضيفت 500 وحدة دولية/مل بنسلين قبل 4-6 ساعات من تجميد السائل المنوي، وأُضيف 1 % غلوكوز كمصدر للطاقة. أما محلول الأندروميد فقد تم تحضير 50 مل منه بإضافة 10 مل من الأندروميد إلى 40 مل من الماء مضاعف التقطير ووضع المحلول الناتج في حمام مائي. عُدلت درجة حموضة المحاليل المحضرة (pH) إلى 6.8، وكذلك الضغط الأسموزي ليصبح 300 ميلي أسموزي.

جمع السائل المنوي:

استعمل في هذه الدراسة ثلاثة ذكور أغنام العواس من طلائق التلقيح الاصطناعي بعمر سنتين ومتوسط أوزانها 75.0±3.0 كغ، لجمع السائل المنوي ومداولته في مختبر التلقيح الاصطناعي ونقل الأجنة في محطة بحوث إزرع التابعة للمركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (أكساد)، تم جمع السائل المنوي من الكباش المدروسة خلال الموسم التناسلي باستعمال المهبل الاصطناعي مرتين أسبوعياً وبمعدل قذفتين في كل مرة ، ووضعت كؤوس الجمع مباشرةً في حمام مائي درجة حرارته 37 م°، وفُحصت القذفات فحصاً عيانياً ومجهرياً بعدها مُددت عينات السائل المنوي بمحاليل التمديد المختلفة، ووضعت في البراد على درجة 4 م° لمدة 2.5 ساعة، ثم جُهز السائل المنوي الممدد في قشات بلاستيكية خاصة (سعتها 0.5 مل) بوساطة آلة التعبئة، ونُقلت القشات إلى جهاز التجميد الإلكتروني وحُفظت بعد تجميدها في خزان السائل الأزوتي على درجة -196م° لفترات طويلة الأمد.

التحليل الآلي للسائل المنوي (CASA):

تم إذابة قشات السائل المنوي في ماء دافئ لمدة 30 ثانية، بعدها تمّ تحليل عينات السائل المنوي بمساعدة جهاز الكازا (Computer Assisted Semen Analysis Vision ® 3.5 ، Germany Tiefenbach, Minitüb Sperm) الموجود في مختبر التلقيح الاصطناعي و نقل الأجنة في كلية الطب البيطري في محافظة حماه/سورية. أخذ 2.5 ميكروليتر من القشة المذابة ووضعت في الحفرة الخاصة بها على شريحة خاصة دُفئت بدرجة حرارة 37 م°. وتم قياس الحركية (Motility%) والتي رُمز لها (MOT)، والحركة التقدمية (Progressive)% والتي رُمزت (PROG)، ومؤشرات الحركة الفردية للنطاف، وهي معدل مسافة المسار DAP (Distance Average Path- µm)، ومسافة الخط المنحني DCL (Distance Curved Line- µm)، ومسافة الخط المستقيم DSL (Distance Straight Line- µm)، ومعدل سرعة المسار VAP (Velocity Average Path- µm /sec)، وسرعة الخط المنحني VCL (Curvilinear Line Velocity-µm/s)، وسرعة الخَط

المستقيم VSL (Staight Line Velocity-µm/s)، وخطية المسار LIN (Linearity %- VSL/VCL)، والإزاحة الجانبية للـرأسِ ALH (Lateral Head Displacement-µm).

التحليل الإحصائي:

حُللت البيانات إحصائياً باستعمال برنامج SAS (2008) وفق الأنموذج الرياضي الآتي:

$$Y_{ij} = \mu + D_i + e_{ij}$$

حيث:

Y_{ij}: المؤشرات المدروسة (الحركية، الحركية التقدمية، معدل مسافة المسار، مسافة الخط المنحني، مسافة الخط المستقيم، معدل سرعة المسار، منحنى السرعة الخطية، منحنى السرعة المستقيمة، خطية المسار، المدى الجانبي لضربات الرأس).

µ: المتوسط العام للمؤشرات المدروسة.

D_i: تأثير محلول التمديد المختبر حيث i=1 (محلول الأندروميد)، i=2 (محلول سترات الصوديوم مع صفار البيض)، i=3 (محلول الحليب).

e_{ij}: الخطأ العشوائي والذي من المفترض أن يكون طبيعي التوزيع وبمتوسط صفر Iσ2.

النتائج والمناقشة

أظهرت النتائج وجود فروق معنوية بين المحاليل الثلاثة المستخدمة (الجدول1)، إذ تبين أن الحركية (MOT) كانت عالية المعنوية (P<0.001) وبلغت 63.42±1.33، 50.93±1.64 و31.76±1.99 في الأندروميد، والسترات، والحليب على التوالي (الشكل1)، كذلك كانت الحركية التقدمية (PROG) عالية المعنوية (P<0.001)، إذ وصلت في محلول الأندروميد إلى 47.71±1.99، وفي محلول السترات 33.25±2.63، وفي محلول الحليب 21.19±1.89 (الشكل1)، وهذا ما أكده Marques وزملاؤه (2006) من أن تركيب محلول التمديد له تأثير في حياة النطاف، وكانت حركية النطاف في السائل المنوي الممدد الحاوي على صفار البيض مع سترات الصوديوم أفضل مقارنةً مع الحليب خالي الدسم (Banu وزملاؤه، 1988)، كما تأثر مؤشر خطية المسار (LIN) بشكل عالي المعنوية (P<0.001) بنوع محلول التمديد المستخدم وبلغت القيم 45 %، 49 % و58 % للأندروميد، والسترات، والحليب على التوالي (الشكل1).

يبيّن الجدول1 وجود فرق عالي المعنوية (P<0.001) في معدل مسافة المسار (DAP) وبلغت أعلى قيمة لها في محلول الأندروميد 21.32±0.53، وأقل قيمة في محلول الحليب 16.06±0.61، ووصلت في محلول السترات إلى 19.74±0.70، وبلغت مسافة الخط المنحني (DCL) للنطاف في محلول الأندروميد 34.73±0.99، بينما بلغت 31.32±1.29، 22.88±1.23 للسترات والحليب على التوالي، وبلغت مسافة الخط المستقيم DSL 15.61±0.32، 15.39±0.50، و 12.95±0.43 للأندروميد، والسترات، والحليب على التوالي، ويظهر الجدول1 وجود فرق عالي المعنوية (P<0.001) في الإزاحة الجانبية للرأس (ALH) بلغ 6.18±0.13، 5.64±0.16، و4.80±0.21 للأندروميد والسترات والحليب على التوالي.

يبين الجدول1 وجود فرق معنوي (P<0.001) في معدل مسافة المسار(DAP) وبلغت أعلى قيمة لها في محلول الأندروميد 21.32±0.53، وأقل قيمة في محلول الحليب 16.06±0.61، وبلغت في محلول السترات إلى 19.74±0.70 (الشكل2)، كما بلغت مسافة الخط المنحني (DCL) للنطاف في محلول الأندروميد إلى 34.73±0.99، و31.32±1.29، 22.88±1.23 للسترات، والحليب على التوالي (الشكل2)، ومسافة الخط المستقيم (DSL) 15.61±0.32، 15.39±0.50، و 12.95±0.43 للأندروميد، والسترات، والحليب على التوالي (الشكل 2). ويوضح الجدول 1 وجود فرق معنوي (P<0.001) في الإزاحة الجانبية للرأس (ALH) بلغ 6.18±0.13، 5.64±0.16، و4.80±0.21 للأندروميد، والسترات، والحليب على التوالي (الشكل2).

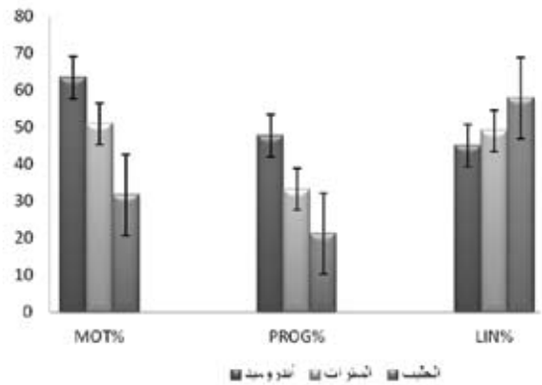
لوحظ أن الإزاحة الجانبية للرأس (ALH) وهو مؤشر تذبذب حركة الرأس انخفضت مع مرور الوقت. أظهرت نتائج Suarez وزملاؤه (1993) أن الإزاحة الجانبية للرأس (ALH) عند نطاف الهامستر يرتبط بانخفاض عنصر الكاليسوم داخل الخلية. كما أشارت معظم دراسات الإخصاب بالأنابيب (Verstegenوزملاؤه، 2002; Farrellوزملاؤه، 1998) إلى أن مؤشر الإزاحة الجانبية للرأس (ALH) على علاقة مع معدلات الإخصاب بالأنابيب (*In- Vitro*) العالية.

الجدول 1. تحليل التباين لتأثير العوامل المدروسة في حركية النطاف ومؤشرات الحركية التقدمية في السائل المنوي الممدد والمجمد عند كباش العواس

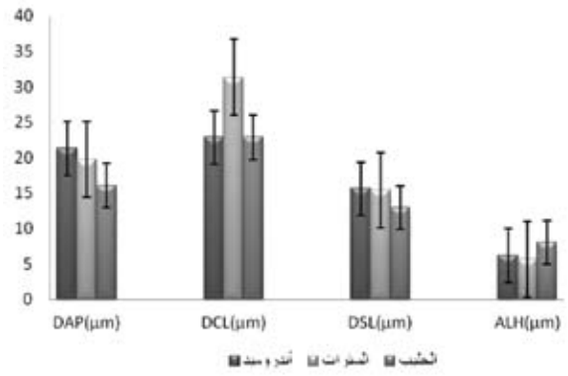
مصدر التباين	درجة الحرية	MOT (%)	PROG (%)	DAP (µm)	DCL (µm)	DSL (µm)	VAP (µm/s)	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	LIN (%)	ALH (µm)
الممددات	2	4577.4***	3174.6***	131.34***	669.6***	39.3***	632.8***	3440.3***	149.9	0.08***	8.6***
الخطأ التجريبي	45	1196.10	2356.29	219.27	846.63	106.93	1402.57	5072.76	683.52	0.095	25.23
C.V معامل الاختلاف	-	0.90	0.78	0.64	0.68	0.56	0.59	0.65	0.49	0.66	0.42
R^2 معامل التحديد	-	10.6	21.2	11.6	14.6	10.5	12.9	14.7	10.8	9	13.5

*** p < 0.001

C.V	Coff Var	DSL	مسافة الخط المستقيم	PROG	الحركية التقدمية	VSL	سرعة الخط المستقيم
R^2	R- Square	VAP	معدل سرعة المسار	DAP	معدل مسافة المسار	LIN	خطية المسار
MOT	الحركية	VCL	سرعة الخط المنحني	DCL	مسافة الخط المنحني	ALH	الإزاحة الجانبية للرأس



الشكل 1. يوضح الحركية (MOT) والحركة التقدمية الأمامية (PROG) ومؤشر خطية المسار (LIN) للنطاف مقدرة كنسبة مئوية بعد إزالة التجميد ضمن محاليل التمديد المختلفة.

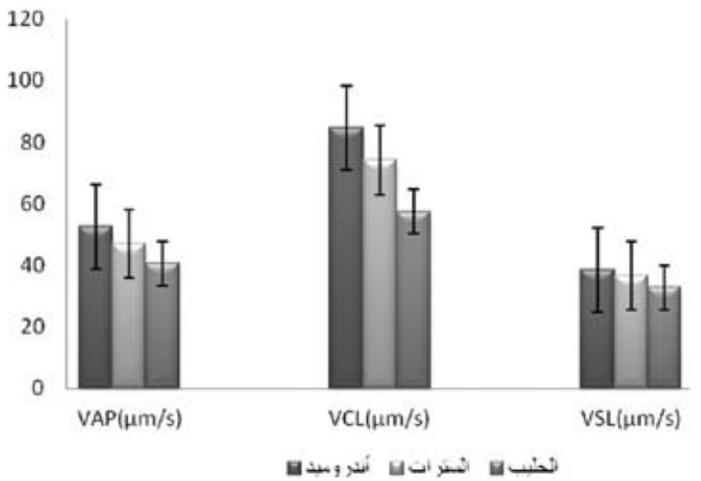


الشكل 2. يوضح معدل مسافة المسار (DAP) ومسافة الخط المنحني (DCL) ومسافة الخط المستقيم (DSL) والإزاحة الجانبية للرأس (ALH) للنطاف بعد إزالة التجميد في محاليل التمديد المختلفة.

فضلاً عن ذلك، بينت نتائج Verstegen وزملائه (1998)، و Farrell وزملائه (1998) أن معدل مسار سرعة النطاف الـ (VAP)، وسرعة الخط المستقيم (VSL) كانت مرتبطة معنوياً مع عدد النطاف الداخلة في البويضة. كما أن سرعة الخط المستقيم (VSL) مؤشر عن التقدم الأمامي للنطاف، ومعدل سرعة المسار مؤشر عن تفعيل النطاف الضروري لبدء عملية الإخصاب (Verstegen وزملاؤه، 2002; Farrell وزملاؤه، 1998). وبين Kirk وزملاؤه (2005) أن المؤشرات السابقة ترتبط مع القدرة الإخصابية للنطاف، وتعد مفيدة بخصوص التنبؤ عن جودة السائل المنوي وقدرته الإخصابية.

يستطيع جهاز CASA تمييز جزء من النطاف المتحركة والساكنة وكذلك تصنيف النطاف على أساس سرعة مسار كل نطفة متحركة، ويقيس

سرعة النطاف المتوسطة وأبعاد مسارها (Joshi وزملاؤه، 2003; Kumar وزملاؤها، 2007). ومعظم المؤشرات التي تميز سرعة النطاف مثل VAP، VSL، و LIN ترتبط بقدرتها الإخصابية (Verstegenوزملاؤه، 2002)، كما ظهر عند الإنسان (Sanchez-Partida وزملاؤه، 1999)، والكباش (Farrell وزملاؤه، 1998)، والثيران (Giwercman وزملاؤه، 2003).



الشكل 3. يوضح معدل سرعة المسار (VAP) وسرعة الخط المنحني (VCL) وسرعة الخط المستقيم (VSL) للنطاف مقدرة بالميكرومتر/ثانية بعد إزالة التجميد في محاليل التمديد المختلفة.

يُعّد قياس سرعة النطاف مؤشراً غير مباشر لوظيفة الميتوكوندري في النطفة (Graham وزملاؤه، 1984). تخضع ميتوكوندريا النطاف إلى أضرار كبيرة أثناء عملية التجميد وإزالة التجميد (Peris وزملاؤه، 2004; Gillan وزملاؤه، 2004)، وتعود هذه الأضرار لانخفاض معدل تنفس النطاف المجمدة (Windsor وزملاؤه، 1997). في الدراسة الحالية كان متوسط سرعة الخط المنحني (VCL) 84.7 في محلول الأندروميد، و74.1، 57.3 في السترات، والحليب على التوالي (الشكل 3). إلا أن التأثير كان غير معنوياً بين السترات ومحلول الشاهد بينما كان معنوياً بين المحلولين السابقين ومحلول الحليب، و يُعزى ذلك إلى الضرر الكبير الذي تعرضت له الميتوكوندريا.

ويوضح الجدول1 وجود فرق عالي المعنوية ($P<0.001$) بين المحاليل الثلاثة بالنسبة لمعدل سرعة المسار (VAP)، إذ بلغت 52.41±1.33، 46.97±1.70 و40.56±1.59 للأندروميد، والسترات، والحليب على التوالي (الشكل 3)، كما سجلت أعلى قيمة لسرعة الخط المستقيم (VSL) في محلول الأندروميد 38.5، وأقل قيمة في محلول الحليب 32.9، وبلغت في محلول السترات 36.7 (الشكل 3). ووجد Juburi –Al (1987) أن محلول السترات يحافظ على حيوية السائل المنوي الممدد بعد الإذابة بشكل أفضل من محلول الحليب (Shrestha, 2005)، وكانت النسبة المئوية للنطاف المتحركة في محلول السترات المضاف إليه 7 % جليسيرول (Das وRajkonwar,a,b1995) أعلى مقارنة مع محلول الحليب (Al-Juburi، 1987)، وبالتالي يحافظ صفار البيض على حركة وسلامة أغلفة النطاف بصورة أفضل من الحليب خالي الدسم (Jones وBavister, 2000; Chehadeh، 2000). ومؤخراً أظهر Moussa و Ahmad (2010) بأن استبدال صفار البيض بجزيئات الـ LDL وهي الليبوبروتينات منخفضة الكثافة إلى ممددات السائل المنوي حسنت بشكل كبير حركية النطاف بعد إزالة التجميد عند الكباش. أما محلول الأندروميد فقد حافظ على حركية النطاف بصورة أفضل مقارنة مع محلول السترات، والحليب (Gil وزملاؤه، 2003)، وهذه النتائج تتفق مع نتائج Yutaka وزملائه (2008) من أن استخدام محاليل تمديد تحتوي مشتقات غير حيوانية تؤدي إلى زيادة في حركة النطاف مقارنة مع محاليل التمديد التي تحتوي مشتقات حيوانية.

الاستنتاجات والمقترحات

يستنتج من هذه الدراسة بأنه يمكن تحضير محاليل تمديد محلية الصنع تحسن حيوية النطاف المجمدة، وتغني عن استيراد محاليل تجارية باهظة الثمن، ويمكن استعمالها في مراكز التلقيح الاصطناعي. علماً أن هذه الدراسة تحتاج لأن تُعزز بإجراء اختبار التلقيح الاصطناعي في الجسم الحي (*In- Vivo*) لتقدير خصوبة السائل المنوي المجمد في هذا الممدد.

المراجع

- زكريا، عبد الحميد وسلهب، سليمان.1991. فيزيولوجيا التناسل والتلقيح، الجزء النظري، جامعة دمشق، سورية.

- Abdel- Hakeam. A. A., E. F. Graham, I. A. Vazquez, and K. M. Chaloner. 1991. Studies On the Absence of Glycerol in Unfrozen and Frozen Ram Semen. Development of an Extender for Freezing: Effects of Osmotic Pressure, Egg Yolk Levels, Type of Sugars, and the Method of Dilution. Cryobiology; 28: 43 - 49.
- Al- Juburi. S. A. 1987. Studies on Preservation of Ram Semen by Freezing and other Methods. Ph. D. Faculty of Agric. Zagazig Univ.
- Anel. L., M. Alvarez, F. Martinez- Pastor, V. Garcia- Macias, E. Anel, and P. de Paz. 2006. Improvement Strategies in Ovine Artificial Insemination. Reprod Domest Anim; 41:30 - 42.
- Bag. S., A. Joshi, S. M. K. Naqvi, P. S. Rawat, and J. P. Mittal. 2002. Effect of Freezing Temperature, at Which Straws were Plunged into Liquid Nitrogen, on the Post- Thaw Motility and Acrosomal Status of Ram Spermatozoa. Anim Reprod Sci; 72: 175 - 183.
- Bailey. J. L., J. F Bilodeau, and N. Cormier. 2000. Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A damaging and Capacitating Phenomenon. J. Androl; 21:17-.
- Banu. L. A., S. S. Hussain, and R. Amin. 1988. The Effect of Goat Milk as Buck Semen Diluter Compared with Egg Yolk- Citrate and Powdered Milk. Bangladesh. J. Anim. Sci.; 17: 7.
- Chehadeh. R. 2000. Studies on Preservation of Male Goat Semen. Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo Univ; 237 P.
- Christine. A. 2008. Recent advances in cooled-semen technology. Animal Reproduction Science; 107(3:(4- 275 - 268.
- Curry. M. R. 2000. Cryopreservation of Semen from Domestic Livestock. Rev Reprod; 5:46 - 52.
- Colbjornsen. EI. 2002. Seminstatistikk Sau 2001 (AI- Statistics 2001 in Ewes). Sau Geit; 3: 5 - 44.
- Das. K. K., and C. K. Rajkonwar. 1995a. Effect on the Motility of Buck Semen during Freezing with Lactose Egg Yolk Glycerol Extender. Inter. J. Anim. Sci; 10: 127P.
- Das. K. K., and C. K. Rajkonwar. 1995b. Effect of Glycerol and Equilibrium time on the Post Thaw Motility of Spermatozoa of Buck in Maltose Egg Yolk Glycerol Extender. Ind. J. Anim. Repord; 16: 57.
- Fair. S. J., P. Hanrahan, A. Donovan, P. Duffy., C. M. O'Mearaa, P. Lonergan and A. C. O. Evans. 2007. Hormonal relationships during the Periovulatory Period among Ewe Breeds Known to Differ in Fertility after Cervical Artificial Insemination with Frozen Thawed Semen. Animal Reproduction Science; 97: 284–294.
- Farrell. P., G. Presicce, C. Brockett, and R. Foote. 1998. Quantification of bull Sperm Characteristics Measured by Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) and the Relationship to Fertility. Theriogenology; 49 : 871- 879.
- Garde. J. J., A. del Olmo, A. J. Soler, G. Espeso, M. Gomendio and E. R. S. Roldan. 2008. Effect of Egg Yolk, Cryoprotectant, and Various Sugars on Semen Cryopreservation in Endangered Cuvier's Gazelle (Gazella Cuvieri). Animal Reproduction Science; 108(3- 4): 384 - 401.
- Gil. J., L. Nils, S. Lennart, and R. Heriberto. 2003. Influence of Extender, Temperature, and Addition of Glycerol on Post- Thaw Sperm Parametrs in Ram Semen. Theriogenology; 59: 1241- 1255.
- Gillan. L., W. M. C. Maxwell and G. Evans. 2004. Preservation and Evaluation of Semen for Artificial Insemination. Reprod Fertil Dev; 16: 447- 454.
- Giwercman. A., J. Richthoff., H. Hjollund., J.Bonde., K. Jepson., B. Frohm., and M. Spano. 2003. Correlation between Sperm Motility and Sperm Chromatin Structure Assay Parameters. Fertil Steril; 80: 1404–1412.
- Graham. E. F., B. G. Carbo and M. M. Pace. 1978. Current Status of Semen Preservation in the Ram, Boar and Stallion. J. Anim. Sci; 47: 80P.
- Graham. E. F., M. K. L. Schmehl and R. C. M. Deyo. 1984. Cryopreservation and Fertility of Fish, Poultry and

Mammalian Spermatozoa. In: Proceedings of the 10th NAAB Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction 1984, Milwaukee, WI. Columbia, MO: National Association of Animal Breeders: 4 - 24.
- Holt. W. V. 2000. Basic Aspects of Frozen Storage of Semen. Anim. Reprod. Sci; 62: 3 - 22.
- Sperm Sorting Methods in Assisted Breeding and Comparative Research. Reprod Fertil Dev; 19: 709718-.
- Jones. J. M and B. D. Bavister. 2000. Acidification of Intracellular PH in Bovine Spermatozoa Suppresses Motility and Extends Viable Life. J. Androl; 21: 24- 61.
- Joshi. A., S. M. K. Naqvi, S. Bag, A. K. Dang, R. C. Sharma, P. S. Rawat and J. P. Mittal. 2003. Sperm Motion Characteristics of Garole Rams Raised for a Prolonged Period in a Semi- Arid Tropical Environment. Trop Anim Hlth Prod; 35: 249- 257.
- Joshi. A., A. K. Mathur, S. M. K. Naqvi and J. P. Mittal. 2006. Influence of Osmolality of Complete Semen Extender on Motion Characteristics of Frozen-Thawed Ram Spermatozoa. Asian-Aust J Anim Sci; 19: 1716-1721.
- Kasimanickam. R., V. Kasimanickam, K. D. Pelzer and J. J. Dascanio. 2007. Effect of Breed and Sperm Concentration on the Changes in Structural, Functional and Motility Parameters of Ram- Lamb Spermatozoa during Storage at 4°C. Anim Reprod Sci; 101:60 - 73.
- Kirk. E. S., E. L. Squires and J. K. Graham. 2005. Comparsion of in Vitro Laboratory Analyses with the Fertility of Cryopreserved Stallion Spermatozoa. Theriogenology; 64:1422- 1439.
- Kumar. D., A. Joshi and S. M .K. Naqv. 2007. Effect of Post-Thaw Incubation on Semen Characteristics of Ram Spermatozoa Cryopreserved under Controlled and Uncontrolled Rate of Cooling. Anim. Reprod; 526-534.
- Laura. M., A. Carla, P. Susanna, D. Maria, C. Fabrizio, C. Bernardo, B. Andrea and C. Pietro. 2005. Benefits of Tempol on Ram Semen Motility and in Vitro Fertility: A preliminary Study. Theriogenology; 63: 2243– 2253.
- Lebouef. B., Ph. Guillouet, F. Batellier, D. Bernelas, J. L. Bonn´e,Y. Forgerit, G. Renaud and M. Magistrini. 2003. Effect of Phosphocaseinate on the in Vitro Preservation of Fresh Semen. Theriogenology; 60: 867 - 877.
- Lillo. A. 1984. Lambing Rates after Single Inseminations of Ewes with Liquid or Deep- Frozen Semen. Anim. Reprod; 3; 373P.
- Marques. C. C., J. P. Barbas, M. C. Baptista, C. Serra, M. I. Vasques, R. M. Pereira, S. C. Gonçalves and A. E. M. Horta. 2006. Reproduction in the Ovine Saloia Breed: Seasonal and Individual Factors Affecting Fresh and Semen Performance, in Vivo and in Frozen Vitro Fertility. In: Animal Products from Mediterranean Area. EAAP Pub; 119: 331 - 336.
- Mary. G., and Abdel- Malak. 1994. Relationship Between Hormonal and Fertility Parameters in Rams. Thesis, Ph. D., Fac. Vet. Med., Cairo Univ.
- Matsuoka. T., H. Imai, H. Kohno, and Y. Fukui. 2006. Effects of Bovine Serum Albumin and Trehalose in Semen Diluents for Improvement of Frozen-Thawed Ram Semen. J. Reprod Dev; 52: 675– 683.
- Medeiros. C. M. O., F. Forell, A. T. D. Oliveira and J. L. Rodriguez. 2002. Current Status of Sperm Cryopreservation. Theriogenology; 57:327- 344.
- Moussa. M., and M. Z. Ahmed. 2010. Cryoprotective effect of Low Density Lipoproteins (LDL) Fraction on Frozen-Thawed Awassi Rams Semen. Journal of Al-Baath University- Syria; 32.(In Arabic).
- Naqvi. S., M. K, A. Joshi, G. K. Das and J. P. Mittal. 2001. Development And Application of Ovine Reproductive Technologies: an Indian experience. Small Rumin; 39: 199– 208.
- Nothling. J. O., D. Gerber., B. Colenbrander., D. Maaike., B. Tynke., and K. Decramer. 2007. The Effect of Homologous Prostatic Fluid on Motility and Morphology of Dog Epididymal Spermatozoa Extended and Frozen in Biladyl with Equex STM Paste or Andromed®. Theriogenology; 67: 264- 275.
- O,Hara. L., J. P. Hanrahan, L. Richardson, A. Donovan, S. Fair, A. C. O. Evans and P. Lonergan. 2010. Effect of Storage duration, Storage Temperature, and Diluent on the Viability and Fertility of Fresh Ram Sperm.

Theriogenology; 73: 541 - 549.
- Paulenz. H., S. Lennart, A. Tormod, H. F. Ove and A. B. Kjell. 2003. Effect of Milk- and TRIS- Based Extenders on the Fertility of Sheep Inseminated Vaginally Once or Twice with Liquid Semen. Theriogenology; 60: 759- 766.
- Peris. S. I., A. Morrier, M. Dufour and J. L Bailey. 2004. Cryopreservation of Ram Semen Facilitates Sperm DNA Damage: Relationship between Sperm Andrological Parameters and the Sperm Chromatin Structure Assay. Androl; 25: 224- 233.
- Salamon. S., and W. M. C. Maxwell. 1995. Frozen Storage of Ram Semen. I. Processing, Freezing, Thawing and Fertility after Cervical Insemination. Anim. Repord. Sci; 37: 185- 249.
- Salamon. S. and W. M. C. Maxwell. 2000. Storage of Ram Semen. Anim Reprod Sci; 62: 77 - 111.
- Sanchez- Partida. L. G, D. P. Windsor, J. Eppleston, B. P. Setchell and W. M. C. Maxwell. 1999. Fertility and its Relationship to Motility CO,Haracteristics of Spermatozoa in Ewes after Cervical, Transcervical and Intrauterine Insemination with Frozen- Thawed Ram Semen. Androl; 20: 280- 288.
- SAS. 2008. User's Guide Statistics (Ver 9.2) SAS institute inc., cary, NC, USA.
- Shrestha. J. N. B. 2005. Conserving Domestic Animal Diversity among Composite Populations. Small Rumin. Res; 56: 3– 20.
- Suarez. S. S., S. M. Varosi, and X. Dai. 1993. Intracellular Calcium Increases with Hyperactivation in Intact, Moving Hamster Sperm and Oscillates with the Flagellar Beat Cycle Proceedings National Academy of Sciences USA V90: 4660 - 4664.
- Tekin. N. 1982. Insemination of Sheep with Frozen Semen: Effect of Different Diluents on Motility, Acrosome Integrity and Sephadex- Filtration of Spermatozoa Processed in Mini- Straws. PhD Thesis, Tierarztliche Hochschule Hannover.
- Tuli. R. K., R. Schmidt- Baullain, and W. Holtez. 1991. Influence of Thawing Temperature on Viability and Release of Glutamic Oxaloacetic Transaminase in Frozen Semen from Boer Goats. Anim. Repord. Sci; 25; 125P.
- Verstegen. J., M. Iguer- Ouada and K. Onclin. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology; 57: 149 - 179.
- Vishwanath. R., and P. Shannon. 2000. Storage of Bovine Semen in Liquid and Frozen State. Anim Reprod Sci; 62:23 - 53.
- Waston. P. F., and I. C. A. Martin. 1975. Effects of Egg Yolk, Glycerol and the Freezing Rate on the Viability and Acrosomal Structures of Frozen Ram Spermatozoa. J. Biol .Sci; 28: 153P.
- Windsor. D. P. 1997. Mitochondrial Function and Ram Sperm Fertility. Reprod Fertil Dev, 9: 279- 284.
- Yutaka. F., K. Hirohide, T. Tetsuro, H. Mami and O. Kentaro. 2008. Fertility after Insemination using Asoybean-Based Semen Extender in Sheep. J . Reproduction and Development; 54(4): 286 - 289.
- Yàniz. J., J. I. Martí, M. A. Silvestre, J. Folch, P. Santolaria, J. L. Alabart and F. López- Gatius. 2005. Effects of Solid Storage of Sheep Spermatozoa at 15 °C on Their Survival and Penetrating Capacity. Theriogenology; 64: 1844 - 1851.

Nº Ref- 319