تقييم إضافة تراكيز مختلفة من الغلوتامين والبرولين إلى محلول تمديد محلي التحضير للسائل المنوي عند ذكور الماعز الشامي

Evaluation of Adding Different Concentrations of Glutamine and Proline into Local Extender for Shami Buck Semen

م. رامي خلوف[1] أ. د. محمد ربيع المرستاني[2-4] د. محمد زهير الأحمد[3]

Khlouf .R M R. Al-Merestani M Z. Al- Ahmad

(1) كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية rami.kh80@hotmail.com

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

(3) قسم الجراحة والولادة، كلية الطب البيطري، جامعة البعث، حماة، سورية.

(4) المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة/أكساد.

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم فاعلية إضافة تراكيز مختلفة من الغلوتامين والبرولين إلى محلول تمديد محلي التحضير (سترات الصوديوم والغلوكوز مع صفار البيض)، ومقارنتها بمحلول التمديد الجاهز ®Andromed كمحلول قياسي لحفظ السائل المنوي لذكور الماعز الشامي.

نُفذت التجربة في محطة بحوث ازرع التابعة للمركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة/ACSAD خلال الموسم التناسلي لقطيع الماعز الشامي، جُمع السائل المنوي من أربعة ذكور (مرة أسبوعياً) باستخدام المهبل الاصطناعي، قُيمت حيوية النطاف باستخدام مجهر ضوئي متغاير الطور، واستخدمت صبغة إيوزين - نيكروزين لتمييز النطاف الميتة، كما تم تقييم السائل المنوي المجمد باستخدام جهاز تحليل السائل المنوي (CASA) لتحديد معايير الحركية المختلفة.

أظهرت النتائج وجود تأثير معنوي ($P<0.05$) لمحاليل التمديد المستخدمة في صفة الحركية بعد التمديد، إذ تفوق ®Andromed على محاليل الدراسة المختلفة (السترات فقط، والسترات مضافاً لها 25 ميلي مول من الغلوتامين، والسترات مضافاً لها 50 ميلي مول من الغلوتامين، والسترات مضافاً لها 25 ميلي مول من البرولين) وكان متوسط الحيوية في محلول ®Andromed 74 % مقابل 59 % و 58 % و 54 % و 63 % للمحاليل الأربعة الأخرى على التوالي، وانخفضت الحركية معنوياً بعد التجميد لتصل في محلول ®Andromed إلى 54 % مقابل 38 % و 37 % و33 % و 42 % للمحاليل الأربعة الأخرى على التوالي.

بينت نتائج التقييم بجهاز CASA وجود فرق معنوي ($P<0.05$) في الحركية (MOT) بين محاليل التمديد المدروسة، وسُجلت أعلى قيمة لها في محلول ®Andromed (71%)، وأقلها في محلول السترات المضاف له 50 ميلي مول غلوتامين (58 %)، ووصلت في محلول السترات المضاف له 50 ميلي مول برولين إلى 65 %، وكانت أعلى من محلول السترات (64 %). وبلغت الحركة التقدمية الأمامية (PROG) 57، 50 و 48 % لمحلول ®Andromed ، والسترات، والسترات المضاف لها 50 ميلي مول برولين. ولم يلاحظ أي فروق معنوية بين محاليل الدراسة بالنسبة لمؤشرات الحركية الأخرى المدروسة.

وبناءً على نتائج هذه الدراسة يمكن اعتماد هذه المحاليل، بديلاً عن محلول ®Andromed المستورد، في تمديد السائل المنوي لذكور الماعز الشامي بالشكل الطازج (جميع المحاليل المختبرة)، أو بالشكل المجمد (محلول سترات الصوديوم والغلوكوز مضافاً لها 50 ميلي مول من البرولين).

الكلمات المفتاحية: السائل المنوي، محاليل التمديد، الغلوتامين، البرولين، ذكور الماعز الشامي، سورية.

©2017 The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry Lands, All rights reserved.

ISSN:2305 - 5243 ; AIF(NSP)-316

Abstract

The aim of this study was to evaluate the addition of different concentrations of glutamine and proline to local diluents (Sodium citrate and glucose with egg yolk, EYC) in comparison to Andromed® as a standard diluent in preservation of Shami buck semen. The experiment was carried out in Ezraa Station- ACSAD during the breeding season in shami goats flock. Semen was collected from four bucks by artificial vagina. Motility was evaluated by using microscope and frozen semen was estimated under CASA system.

Results showed that there was a significant effect ($P<0.05$) of extenders in the rate of motility after dilution, where that Andromed® prevailed over other different extenders (EYC, EYC with 25 mM glutamine, EYC with 50 mM glutamine, EYC with 50 mM proline). The motility was 74, 59, 58, 54, and 67% respectively. The motility reduced After freezing to 54, 38, 37, 33, and 42% respectively.

Results of CASA showed significant effect ($P<0.05$) in MOT from the studied extenders, it was 71, 64, 63, 58, and 65% respectively. PROG was 57, 50, 47, 41, and 48% respectively. It wasn›t noticed any significant differences in the studied extenders for other motility indicators.

According to the results of this study these extenders can be used as alternatives of Andromed® for extending shami goat semen as fresh diluted (all undertestable extenders) or frozen (EYC with 50 mM proline).

Key word: Semen, Diluents, Glutamine, Proline, Shami bucks, Syria

المقدمة

تؤدي محاليل تمديد السائل المنوي دوراً مهماً في نجاح أو فشل عملية التلقيح الاصطناعي وفي تحديد تكاليفها، و يختلف تركيبها من بلد إلى آخر (Marques وزملاؤه، 2006). لكن يشترط فيها أن تكون سهلة التحضير، وموادها في أغلبها متوفرة محلياً، ورخيصة الثمن (سلهب وزايد، 1994). والمعروف أن محلول التمديد لا يزيد من خصوبة النطاف، بل يحافظ عليها ويطيل فترة حيويتها (سلهب وسلوم، 2010). تحوي محاليل التمديد على مادة غذائية تُعد مصدراً للطاقة (Lahnsteiner وزملاؤه، 2003)، ومحلول واق يحافظ على درجة حموضة الوسط المحيط بالسائل المنوي ضمن الحدود الطبيعية (العاني وزملاؤه، 2008)، وصادات حيوية (Antibiotics) تمنع نمو الجراثيم (Mazur، 1985)، وتقلل من إمكانية انتقال الأمراض (Johnston وزملاؤه، 1998)، ومواد واقية كالغليسيرول (Garner،1991)، وصفار البيض (Holt، 2000) تحمي النطاف من صدمات التجميد وآثارها الضارة المتمثلة بتشكل بلورات ثلجية داخل الخلايا مسببةً جفافها (Amann وPickette، 1987). لكن معظم هذه المواد (الغليسيرول) تملك سميةً واضحةً للنطاف (Garner، 1991; Katkov وزملاؤه، 1998)، لذلك يتم استخدام مواد أخرى كالأحماض الأمينية (Khlifaoui وزملاؤه، 2005) تؤمن حمايةً كافيةً للنطاف دون تأثير سمي.

إن دراسة تأثير الأحماض الأمينية في تجميد نطاف الحيوانات الثديية كانت موضوعاً وهدفاً للعديد من البحوث منذ أكثر من عشرين سنة مضت (Koskinen وزملاؤه، 1989)، إذ وجد Anchordoguy وزملاؤه (1988) أن بعض المتعضيات الدقيقة تقوم بتصنيع العديد من الأحماض الأمينية عند تعرضها لدرجات حرارة منخفضة، واتضح أن بعض هذه الأحماض تحمي أنواعاً من الخلايا الحيوانية كالنطاف خلال عملية التجميد (Al-Ahmad وزملاؤه، 2008). ويتراكم البرولين في بعض النباتات أثناء انخفاض درجات الحرارة (Aspinall و Paleg، 1981)، ولوحظ أنه يؤدي دوراً مهماً في حماية النطاف عند انخفاض درجة الحرارة، وبالتالي يحسن حركيتها عند إضافته مع واقيات البرودة التقليدية كالغليسيرول (Kundu وزملاؤه، 2001). وقد بينت دراسات عديدة التأثير الواقي من البرودة للأحماض الأمينية أو طلائعها أثناء تجميد السائل المنوي للكباش (Sanchez-Partida وزملاؤه، 1992)، والخيول (Koskinen وزملاؤه، 1989)، والإنسان (Renard وزملاؤه، 1996). وبين Trimeche وزملاؤه (1996) الآثار النافعة للغلوتامين في عملية تجميد وإذابة السائل المنوي لحمار بواتو.

يُعد محلول التمديد بصفار البيض أكثر المحاليل شيوعاً في تمديد السائل المنوي للماعز، إذ تعود أهميته إلى احتوائه على الفوسفوليبيدات، والكوليسترول، وجزيئات الليبوبروتينات منخفضة الكثافة كالليستين، والتي تسهم في الحفاظ على سلامة الأغشية الخلوية للنطاف (Moussa وزملاؤه، 2002)، ومادتها الوراثية خلال الحفظ بالتجميد (Amirat وزملاؤها، 2004)، لذلك يعد صفار البيض من أهم المكونات المستخدمة لحماية النطاف عند حفظها بالتجميد (Tuli وHoltz، 1994)، كما يُعد مصدراً غذائياً جيداً لها (Roca وزملاؤه، 1997).

تمثل سترات الصوديوم أساساً للعديد من المحاليل الواقية التي تستخدم في تمديد السائل المنوي لمعظم الأنواع الحيوانية، وأصبح استخدامها شائعاً من قبل الكثير من جمعيات مداولة السائل المنوي وتصنيعه. ووجد أن إضافة سترات الصوديوم لمحاليل التمديد تحافظ على نوعية السائل المنوي بعد الإذابة (Tekin، 1982). وفي الآونة الأخيرة استخدم محلول Andromed® (الأندروميد) من إنتاج شركة Minitüb الألمانية

في تمديد السائل المنوي للماعز، وهو يمتاز بسهولة تحضيره وخلوه من المواد ذات الأصل الحيواني (Nöthling وزملاؤه، 2007).
يهدف هذا البحث إلى دراسة تأثير إضافة تراكيز مختلفة من الحمضين الأمينيين الغلوتامين والبرولين إلى ممدات السائل المنوي لذكور الماعز الشامي في سورية، وتحديد التراكيز الأفضل المضافة إلى محلول التمديد محلي التحضير (سترات الصوديوم والغلوكوز مع صفار البيض)، بهدف الوصول إلى محلول تمديد مناسب يحضر محلياً لحفظ السائل المنوي للماعز بجودة مقاربة لجودة محاليل التمديد.

مواد البحث وطرائقه

مكان اجراء البحث:

نُفذ البحث في مخبر التلقيح الاصطناعي ونقل الأجنة في محطة بحوث ازرع (درعا، سورية) التابعة للمركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (ACSAD)، ومخبر التلقيح الاصطناعي ونقل الأجنة في كلية الطب البيطري بجامعة البعث في محافظة حماة. استخدمت أربعة ذكور من الماعز الشامي مخصصة كطلائق تلقيح اصطناعي في المحطة لصالح البحث لجمع السائل المنوي، وكانت متماثلة بالعمر (ثلاث سنوات)، وبلغ متوسط وزنها 83 ± 5.6 كغ.

جمع السائل المنوي ومداولته:

جُمع السائل المنوي باستخدام المهبل الاصطناعي مرةً واحدةً أسبوعياً من كل ذكر، وبمعدل قذفتين في كل مرة ولمدة أربعة أشهر خلال الفصل التناسلي لعام 2011. بلغ متوسط حجم القذفتين معاً 1.68±0.80 مل، ومتوسط تركيز الحيوانات المنوية فيهما 2.56±0.90 مليار نطفة/مل، وباعتبار أن الذكور المستخدمة مختبرة سابقاً ولا يوجد فرق معنوي في مواصفات سائلها المنوي، فقد تم دمج جميع القذفات، وتقسيمها بالتساوي إلى عدد المعاملات المدروسة.

محاليل تمديد السائل المنوي:

استُخدم نوعان من المحاليل لتمديد السائل المنوي كما يلي:

1 ـ محلول محلي التحضير (80 % سترات الصوديوم مع الغلوكوز و 20 % صفار البيض)، وأضيف إليه الغليسيرول بتركيز 6.4 %، وكل من الغلوتامين، والبرولين بتركيز 25 و 50 ميلي مول.

2 ـ محلول جاهز التحضير مستورد ®Andromed (أندروميد) يحوي مادة Tris، وحمض السيتريك، ومضادات أكسدة، وسكر، ومواد واقية، وغليسرول وماء مقطر، إضافةً إلى أربعة أنواع من الصادات الحيوية (التايلوزين، والجنتامايسين، والستربتومايسين، واللينكومايسين) بتراكيز غير موضحة في النشرة.

المؤشرات المدروسة وطريقة التقدير:

استخدم مجهر تغاير الأطوار لتقدير النسبة العامة لحركية النطاف، وتم تقدير نسبة النطاف الميتة باستخدام صبغة الأيوزين ـ نيكروزين في كل مرحلة من مراحل مداولة السائل المنوي (طازج، ممدد ومبرد، ممدد ومجمد)، كما استُخدم جهاز CASA (تحليل السائل المنوي بالحاسوب) (®Computer-Assisted Semen Analysis– CASA, Sperm Vision)، 5.3 من انتاج شركة (Minitüb، Tiefenbach، Germany) الموجود في مخبر التلقيح الاصطناعي ونقل الأجنة في كلية الطب البيطري في حماه، لتنفيذ تقدير دقيق لبعض المؤشرات الحيوية للسائل المنوي. بعد إذابة السائل المنوي بوضع القشة في ماء دافئ لمدة 30 ثانية، أخذت كمية 2.5 ميكروليتر من العينة، ووضعت في الحفرة الخاصة بها على شريحة مدفئة بدرجة حرارة 37 م°. وتم قياس المؤشرات التالية:

- الحركية العامة Motility (%).
- الحركية التقدمية Progressive (%).
- معدل مسافة المسار DAP (Distance Average Path- µm).
- مسافة الخط المنحني DCL (Distance Curved Line- µm).
- مسافة الخط المستقيم DSL (Distance Straight Line- µm).
- معدل سرعة المسار VAP (Velocity Average Path- µm /sec).
- منحنى السرعة الخَطِّية VCL (Curvilinear Line Velocity-µm/s).
- السرعة الخَطِّية المستقيمة أوالتقدمية VSL (Staight Line Velocity-µm/s).
- خطية المسار LIN (Linearity % VSL/VCL).
- المدى الجانبي لضربات الرأس ALH (Lateral Head Displacement-µm).

التحليل الاحصائي:

حُللت البيانات وفق التجارب العاملية، باستخدام الأنموذج الخطي العام General Linear Model (GLM)، واستخدم لذلك الغرض برنامج SAS (2008)، وحُسبت الفروق المعنوية، وأقل فرق معنوي Least Significant Different (LSD) بين المتوسطات، واستخدم الأنموذج الرياضي التالي لتوصيف المتغيرات المدروسة :

$$Y_{ijk} = \mu + Di + T_j + e_{ijk}$$

حيث :

Y_{ijk}: المؤشر المدروس

μ: المتوسط العام للمؤشر

D_i : تأثير محلول التمديد (1 - 6)

T_j : تأثير المعاملة (1 - 5)

e_{ijk}: الخطأ التجريبي

النتائج والمناقشة

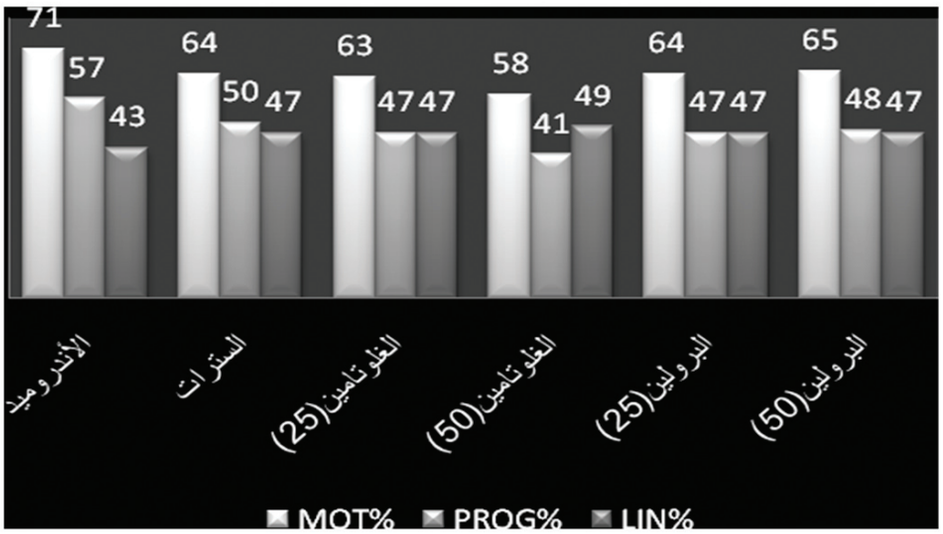
أظهرت النتائج وجود تأثير معنوي ($P<0.05$) لمحلول التمديد في حيوية النطاف (الحركية العامة)، ونسبة الميت منها لكل مرحلة من مراحل مداولة السائل المنوي، ووصلت الحركية بعد التمديد إلى 74 % في محلول الأندروميد، و 59 و 67 % للسترات، والسترات المضاف لها 50 ميلي مول/مل برولين، وبلغت نسبة النطاف الميتة 21.4، 35.8 و 28 % للأندروميد، والسترات، والسترات المضاف لها 50 ميلي مول/مل برولين على التوالي (الجدول 1). ولوحظ انخفاض الحركية بعد التبريد لتصل إلى 69، 53 و61 % في محلول الأندروميد، والسترات، والسترات المضاف لها 50 ميلي مول/مل برولين على التوالي، ووصلت نسبة النطاف الميتة إلى 27 % في محلول الأندروميد، و 44.4 و 34.6% في محلول السترات، والسترات المضاف لها 50 ميلي مول/مل برولين على التوالي. وانخفضت حيوية النطاف بعد التجميد لتصل إلى 54 % في محلول الأندروميد و 38 و 46 % للسترات، والسترات المضاف لها 50 ميلي مول/مل برولين على التوالي. وتزايدت نسبة النطاف الميتة بعد التجميد لتصل إلى 38.6 % في محلول الأندروميد، و 59.2 % في محلول السترات، و 48 % في محلول السترات المضاف لها 50 ميلي مول/مل برولين.

كما بينت النتائج (الشكل1) وجود فروق معنوية ($p<0.05$) بالنسبة للحركية بين المحاليل المدروسة، إذ وصلت أعلى قيمة للحركية إلى 71 % في محلول الأندروميد، وأقلها 58 % في محلول السترات المضاف له 50 ميلي مول/مل غلوتامين، وبلغت الحركية التقدمية 57، 50، 47 و48 % للأندروميد، والسترات، والسترات المضاف لها 25 ميلي مول/مل غلوتامين، والسترات المضاف لها 50 ميلي مول/مل برولين على التوالي، وبلغت خطية المسار(LIN) 43 % في محلول الأندروميد، و47 % في كل من محلول السترات، ومحلول السترات المضاف لها 50 ميلي مول برولين على التوالي (الشكل 1).

الجدول 1. حيوية النطاف، ونسبة النطاف الميتة في السائل المنوي الممدد خلال مراحل مداولة السائل المنوي في ذكور الماعز الشامي.

الممدد	بعد التمديد		بعد التبريد		بعد التجميد	
	الحركية (%)	النطاف الميتة (%)	الحركية (%)	النطاف الميتة (%)	الحركية (%)	النطاف الميتة (%)
أندروميد	74±2.45^{a}	21.4±1.54^{d}	69±2.45^{a}	27±1.76^{d}	54±2.45^{a}	38.6±2.04^{e}
السترات	59±2.92^{bc}	35.8±1.85^{ab}	53±2.55^{bcd}	44.4±2.46^{ab}	38±2.55^{cd}	59.2±2.22^{ab}
غلوتامين (25)	58±2.94^{bc}	34.4±1.89^{b}	52±2.56^{cd}	40.8±2.56^{bc}	37±2.25^{cd}	54.6±2.79^{bc}
غلوتامين (50)	54±2.92^{c}	40.8±2.97^{a}	47±2.57^{d}	51.20±2.52^{a}	33±2.55^{d}	65.2±1.56^{a}
برولين (25)	63±3.74^{bc}	30.6±2.06^{bc}	56±3.32^{bc}	40±2.30^{bc}	42±2.56^{bc}	51.8±1.93^{cd}
برولين(50)	67±3.39^{ab}	28±1.82^{c}	61±3.34^{ab}	34.6±2.42^{c}	46±1.87^{b}	48±1.82^{d}

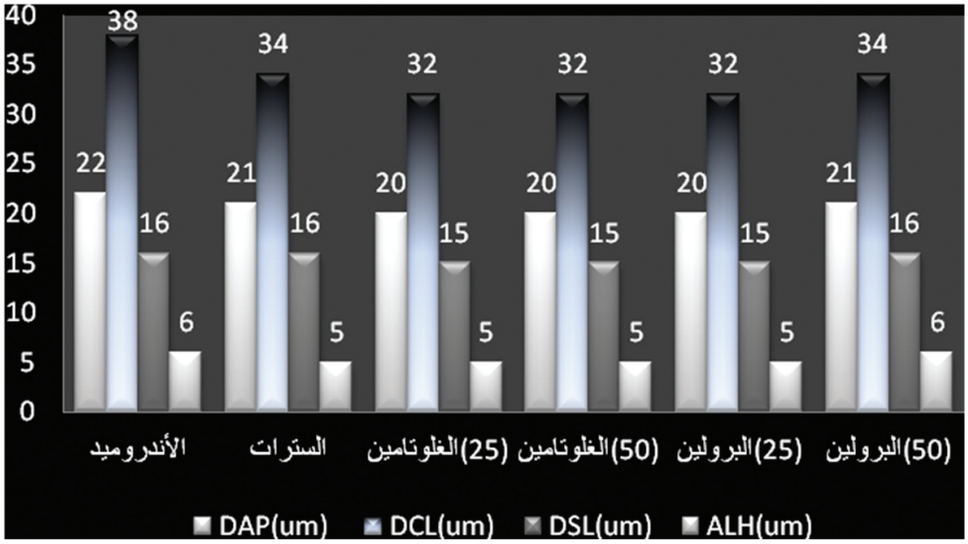
تشير الأحرف المختلفة في العمود الواحد للصفة المدروسة إلى وجود فرق معنوي ($p<0.05$) بين المتوسطات.



الشكل1. قيم الحركية العامة (MOT%)، والحركية التقدمية (PROG%)، وخطية المسار (LIN%) للنطاف بعد إزالة التجميد في محاليل التمديد المختلفة.

ويوضح الشكل 2 وجود فرق معنوي ($P<0.05$) في معدل مسافة الخط المنحني (DCL) للحيوان المنوي، إذ بلغت 38، 32 و 34 للأندروميد، والسترات المضاف لها 25 ميلي مول/مل غلوتامين، و السترات المضاف لها 50 ميلي مول/مل برولين على التوالي.

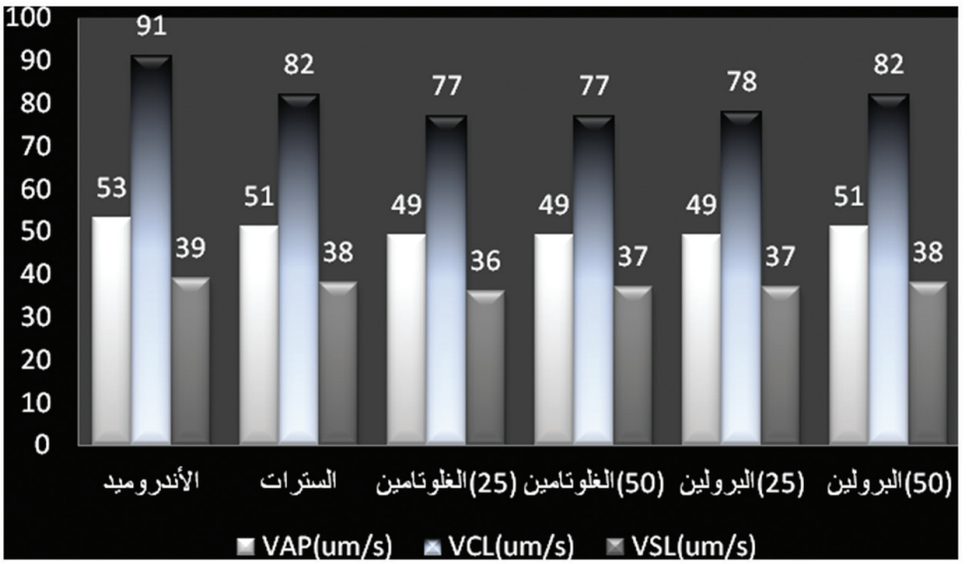
كما يبين الشكل نفسه وجود فرق معنوي في معدل مسافة المسار(DAP)، وسجلت أعلى قيمة (22) في محلول الأندروميد، وأقلها 20 في محلول السترات المضاف له 50 ميلي مول/مل غلوتامين. كما تأثر المدى الجانبي لضربات الرأس (ALH) بنوع محلول التمديد وبلغ 6، 5 و 6 ميكرومتر في محلول الأندروميد، والسترات، والسترات المضاف لها 50 ميلي مول برولين على التوالي (الشكل 2).



الشكل 2. قيم معدل مسافة المسار (DAP)، ومسافة الخط المنحني (DCL)، ومسافة الخط المستقيم (DSL)، والمدى الجانبي لضربات الرأس (ALH) للنطاف بعد إزالة التجميد في محاليل التمديد المختلفة.

تبين وجود فرق معنوي ($P<0.05$) بين المحاليل المدروسة بالنسبة لمعدل سرعة المسار (VAP) وبلغت 53، 51 و 49 للأندروميد، والسترات، و السترات المضاف لها 25 ميلي مول/مل برولين على التوالي (الشكل 3).

ووصلت السرعة المستقيمة (VSL) إلى 39 في محلول الأندروميد، و 38 و 37 في السترات والسترات المضاف لها 25 ميلي مول/مل برولين على التوالي (الشكل 3).



الشكل3. قيم معدل سرعة المسار (VAP)، ومنحنى السرعة المنحنية (VCL)، والسرعة المستقيمة (VSL)، للنطاف بعد إزالة التجميد في محاليل التمديد المختلفة.

بينت النتائج وجود تأثير معنوي ($P<0.05$) لمحلول التمديد في قدرته على حفظ حيوية النطاف في كل مرحلة من مراحل مداولة السائل المنوي (الجدول 1)، وقد تفوق المحلول المستورد (الأندروميد) على المحلول المحلي (سترات الصوديوم مع صفار البيض)، وهذا ما أكده Yutaka وزملاؤه (2008) بأن محاليل التمديد التي تحوي مشتقات ذات مصدر غير حيواني تزيد حركية النطاف مقارنة بالمحاليل التي تحوي هذه المشتقات. لكن بالمقابل أشار Chehadeh (2000) إلى أن صفار البيض يحافظ على سلامة أغشية النطاف الخارجية.

وأوضحت النتائج أن حركية النطاف ازدادت بعد التجميد والإذابة من 38 % في محلول السترات إلى 46 % في محلول السترات المضاف لها 50 ميلي مول برولين (الجدول 1)، وهذه النتائج تتفق مع نتائج الدراسة التي قام بها Sanchez- Partida وزملاؤه (1992) والتي أظهرت أن إضافة 54 ميلي مول برولين قدم حمايةً لنطاف الكبش، ووصلت الحركية بعد الإذابة إلى 42 % في محلول السترات المضاف لها 25 ميلي مول برولين، وهذا ما أكده أيضاً Trimeche وزملاؤه (1999) بأن استخدام تراكيز منخفضة (10-20) ميلي مول من البرولين والغلوتامين حسن بشكل ملحوظ حيوية النطاف بعد الإذابة. كما بين Kruuv و Glofcheski (1992) في دراسات أجروها على جرذ الهامستر الصيني التأثير الواقي من البرد للأحماض الأمينية في النطاف عند استخدامها بتراكيز قدرها 10 إلى 90 ميلي مول، واستنتجا أن إضافة الغلوتامين والبرولين أعطت أفضل حماية عند استخدامها بتراكيز 10 إلى 40 ميلي مول.

أظهرت نتائج هذه الدراسة أيضاً أن التركيز المثالي للغلوتامين هو 25 ميلي مول، وهذه النتائج تتفق مع Al-Ahmad وزملائه (2008) من حيث أن الغلوتامين يملك تأثيراً واقياً من البرودة أثناء عملية تجميد وإذابة السائل المنوي لذكور الماعز من سلالتي الألبين والسانين، إذ كان التركيز المناسب له في محاليل التمديد المستخدمة 25 ميلي مول، وهذا التركيز أعلى من ذلك المستخدم عند الثيران والمقدر بـ 10 ميلي مول (Moussa وزملاؤه،2002 و Amirat وزملاؤها، 2009)، لكنه أقل من التركيز المستخدم عند الفصيلة الخيلية والمقدر بـ 30 ميلي مول (Trimeche وزملاؤه، 1999)، أو 50 ميلي مول (Khlifaoui وزملاؤها، 2005)، وأيضاً عند كل من الإنسان (Renard، 1996)، و الحمار (Trimeche وزملاؤه، 1996) والمقدر بـ 80 ميلي مول.

بينت دراسات أخرى أن إضافة 40 و 70 ميلي مول من الغلوتامين كانت أكثر فعالية لحفظ السائل المنوي المجمد عند الإنسان (Lalonde وزملاؤه، 1991)، وعند الفصيلة الخيلية (Trimeche وزملاؤه، 1999) على التوالي، كما أوضح Trimeche وزملاؤه (1998) أن التأثيرات الوقائية للغلوتامين والبرولين كانت واضحةً عندما استُخدم مدى واسع من التراكيز (10 و 80 ميلي مول).

وقد طُورت عدة فرضيات لتوضيح دور الأحماض الأمينية في حماية النطاف أثناء عمليتي التجميد والإذابة، وبين كلاً من Noguchi و Matsmuto (1971) أن غلوتامات الصوديوم تحمي بعض الأنزيمات، وتحمي بعض الأحماض الأمينية بالمشاركة مع الغليسيرول أنزيم Calcium–ATPase أثناء عملية التجميد (Lalonde وزملاؤه،1991)، كما يحمي البرولين أنزيم فوسفوفركتوكيناز من الإنفصال أوالتمسخ (Denaturation) أثناء عملية التجميد (Carpenter وزملاؤه، 1986)، وبعضها يحمي أنزيم نازع هيدروجين الكحول (Heinz وزملاؤه، 1990)، وأنزيم نازع هيدروجين اللاكتات (Carpenter وCrow، 1988)، كما أن الأحماض الأمينية كجزيئات مشحونة يمكن أن تتفاعل مع المجموعات الفوسفاتية لليبيدات الفوسفورية الغشائية، مما يؤدي إلى تشكل طبقة تغلف الغشاء السيتوبلازمي وتحميه من صدمات البرودة (Kundu، 2001)، وأوضح Trimach

وزملاؤه (1996) أن الغلوتامين وصفار البيض يؤدي دوراً تشاركياً في حماية النطاف بعد التجميد عند حمار بويتو.

استخدم جهاز تحليل السائل المنوي بمساعدة الحاسوب (CASA) كتقانة إختبارية دقيقة لتمييز النطاف المتحركة، والساكنة، وتصنيفها على أساس سرعة مسار كل نطفة متحركة، وأبعاد مسارها (Joshi وزملاؤه، 2003 وKumar وزملاؤها، 2007)، وتقييم خصائص الحركية الجماعية، ومؤشرات الحركية الفردية للنطاف بعد التجميد. وبلغت الحركية الجماعية (MOT) 71% في الأندروميد، و 64، 65 % في محلول السترات، والسترات المضاف لها 50 ميلي مول/مل برولين على التوالي، ووصلت الحركية التقدمية (PROG) إلى 57، 50 و48 % للأندروميد، والسترات، والسترات المضاف لها 50 ميلي مول/مل برولين على التوالي، وبلغ معدل مسافة المسار (DAP) 22 ميكرومتر في محلول الأندروميد، و 21، 21 ميكرومتر في محلول السترات، والسترات المضاف لها 50 ميلي مول/مل برولين على التوالي. وترتبط معظم المؤشرات التي تميز سرعة النطاف مثل VSL، VAP، وLIN بقدرتها الإخصابية (Vertegen وزملاؤه، 2002)، كما ظهر عند الإنسان (Sanchez-Partida وزملاؤه، 1999)، والكباش (Farrell وزملاؤه، 1998)، والثيران (Giwercman وزملاؤه، 2003).

استنتج من هذه الدراسة أنه يمكن اعتماد محاليل التمديد المحضرة محلياً، والمضاف لها تراكيز مختلفة من الأحماض الأمينية في تمديد السائل المنوي لذكور الماعز الشامي بشكل طازج وممدد، وحفظه لفترات طويلة.

المقترحات

- يمكن إضافة 50 ميلي مول من البرولين إلى محلول تمديد محلي التحضير (سترات الصوديوم والغلوكوز مع صفار البيض)، واستخدامه في حفظ السائل المنوي لذكور الماعز الشامي لفترات طويلة الأمد.
- يمكن إضافة 25 ميلي مول من البرولين والغلوتامين إلى محلول تمديد محلي التحضير (سترات الصوديوم والغلوكوز مع صفار البيض)، واستخدامه في حفظ السائل المنوي لذكور الماعز الشامي لفترات قصيرة الأمد.
- متابعة الدراسات في مجال إضافة بعض الأحماض الأمينية والفيتامينات إلى محاليل تمديد السائل المنوي لتحسين فعاليتها في حفظ السائل المنوي المجمد.

المراجع

- العاني، أحمد؛ اسحق، محمد؛ الراوي، عبد الرزاق؛ عبد الكريم، طلال. 2008. السلوك الجنسي وصفات السائل المنوي للعجول متباينة القدرات الوراثية لإنتاج الحليب. المجلة الأردنية في العلوم الزراعية، المجلد 4، العدد 1.
- سلهب، سليمان؛ زايد، عبد الله. 1994. فيزيولوجيا التناسل والتلقيح الاصطناعي، الجزء العملي. جامعة عمر المختار، الجماهيرية العربية الليبية الشعبية الاشتراكية العظمى.
- سلهب، سليمان؛ سلوم، عبير.2010. فيزيولوجيا التناسل في الحيوانات الزراعية، الجزء العملي. جامعة دمشق- سورية.
- Al-Ahmad, M. Z., G. Chatagnon., L. Amirat- Briand., M. Moussa., D. Tainturier., M. Anton and F. Fieni. 2008. Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. Reprod Dom Anim; 43: 429– 436.
- Amann, R. P., and B. W, Pickett. 1987. Principles of cryopreservation and areview of cryopreservation of stallion spermatozoa. Equine Vet Sci ;7: 145-173.
- Amirat, L., D. Tainturier., L. Jeanneau., C. Thorin., O. Gerard., and J. L. Courtens. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl1, a commercial egg yolk xtender. Theriogenology; 61: 895– 907.
- Amirat- Briand, L., D. Bencharif., O. Vera- Munoz., H. Bel Hadj Ali., S. Destrumelle., S. Desherces., E. Schmidt., M. Anton., and D. Tainturier. 2009. Effect of glutamine on post-Thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low density lipoproteins) extender: Preliminary results. Theriogenology; 71: 1209– 1214.
- Anchordoguy, T., J. F. Carpenter., S. H. Loomis., and J. H. Crow. 1988. Mechanisms of interaction of amino acids with phospholipids bilayers during freezing. Biochem Biophys Acta; 946: 299– 306.
- Aspinall, D., and L. G. Paleg. 1981. Proline acwnulation: Physiological aspects. In: Paleg LG, Aspinall D (eds), The

physiological and biochemistry of drought resistance in plants. Sydney: Academic Press; 264- 309.
- Carpenter, J. F., S. C. Hand., L. M. Crowe., and J. H. Crowe. 1986. Cryoprotection of phosphofructokinase with organic solutes:Characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. Arch Biochem Biophys; 250: 505- 512.
- Carpenter, J., and J. Crow. 1988. The mechanism of cryoprotection of protein by solutes. Cryobiology; 25: 244– 255.
- Chehadeh, R. 2000. Studies on preservation of male goat semen. department of Theriogenology, faculty of veterinary medicine, Cairo Univ; 237 P.
- Farrell, P., G. Presicce., C. Brockett., and R. Foote. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computerassisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. Theriogenology; 49: 871– 879.
- Garner, D. 1991. Artificial insemination. In: Cupps PT (ed.), Reproduction in domestic animals. Academic Press, San Diego; 251–278.
- Giwercman, A., J. Richthoff., H. Hjollund., J.Bonde., K. Jepson., B. Frohm., and M. Spano. 2003.Correlation between sperm motility and sperm chromatinstructure assay parameters. Fertil Steril; 80: 1404– 1412.
- Heinz, K. A., D. J. Glofcheski., J. R. Lepock., and J. Kruuv. 1990. Mechanism of freeze-Thaw damage to liver alcohol dehydrogenase and protection by cryoprotectants and amino acids. Cryobiology; 27: 521- 538.
- Holt. W. V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. Anim. Reprod. Sci; 62: 3– 22.
- Johnston, S. D., D. O, Boyle., A. J. Frost., M. R. Gowan., A. Tribe., and D. Higgins. 1998. Antibiotics for the preservation of koala _Phascolarctos cinereus. semen. Aust. Vet. J; 76: 335– 338.
- 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.
- Katkov, I. I., N. Katkova., J. K. Crister., and P. Mazur. 1998. Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: Chemical toxicity v. s. osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. Cryobiology; 37: 325– 38.
- Khlifaoui, M., I. Battut., J. F. Bruyas., G. Chatagnon., A. Trimeche., and D. Tainturier. 2005. Effects of glutamine on post-Thaw motility of stallion spermatozoa: An approach of the mechanism of action at spermatozoa level. Theriogenology; 63: 138– 149.
- Koskinen, E., M. Junnila., T. Katila., and H. Soini. 1989. A preliminary study on the use of betaine as a cryoprotective agent in deep freezing of stallion semen. J. Vet Med Assoc; 36: 110- 114.
- Kruuv, J. and D. J. Glofcheski. 1992. Protective effect of amino acids against freeze- Thaw damage in mammalian cells. Cryobiology; 29: 291- 295.
- 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.
- Kundu, C. N., K. Das and G. C. Majumder. 2001. Effect of amino acids on cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. Cryobiology; 41: 21- 27.
- Lahnsteiner, F., B. Berger., and T. Weismann. 2003. Effects of media, fertilization technique extender, straw volume, and sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen. Theriogenology; 5: 829– 841.
- Lalonde, R., J. Lepock., and J. Kruuv. 1991. Site of freeze- Thaw damage and cryopreservation by amino acids of the calcium ATPase of the sarcoplasmic reticulum. Biochem Biophys Acta; 1079: 128– 138.
- 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.

- Mazur, P. 1985. Basic concepts in freezing cells. L. A. and Larsson. K. (eds) deep freezing of boar Semen. Swedish Univ. of Agriculture Sci. Uppsala,pp.91.
- Moussa, M., V. Martinet., A. Trimeche., D. Tainturier., and M. Anton. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: Cryoprotective effect on frozen- Thawed bull semen. Theriogenology; 57: 1695-1706.
- Noguchi, S., and J. Matsmuto. 1971. Studies on the control of the denaturation of the fish muscle proteins during frozen storage II. Preventing effect of amino acids and related compounds. Bull Japn Soc Sci Fish: 37; 1115–1122.
- Nöthling, J. O., D. Gerber., B. Colenbrander., M. Dijkstra., T. Bakker 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.
- Renard, P., G. Grizard., J. F. Griveau., B. Sion., D. Boucher., and D. Le Lannou. 1996. Improvement of motility and fertilization potential of post-Thaw human sperm using amino- Acids. Cryobiology; 33: 311– 9.
- Roca ,J. J., A. Carrizosa., I. Campos., A. Lafuente., J. M. Vazquez., and E. Martinez. 1997. Viability and fertility of washed murciano–Granadina goat spermatozoa diluted in tris - Egg yolk extender and stored at 5ºC. Small Rum. Res; 25: 147-153.
- SAS, 2008. User's guide statistics (Ver 9.2) SAS institute inc., cary, NC, USA.Scanchez- Partidata. L. G., W. M. C. Maxwell., L. G. Paleg., and B. P. Setchell. 1992. Proline and glycine betaine in cryoprotective diluents for ram spermatozoa. Reproduction and Fertility Development; 4: 113- 118.
- Sanchez- Partida, L. G., D. P. Windsor., J. Eppleston., B. P. Setchell., and W. M. C. Maxwell. 1999. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical and intrauterine insemination with frozen- Thawed ram semen. J. Androl; 20: 280- 288.
- 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.
- Trimeche, A., P. Renard., D. Le Lannou., P. Barriere., and D. Tainturier. 1996. Improvement of motility of post- Thaw Poitoujackass sperm using glutamine. Theriogenology; 45: 1015-1027.
- Trimeche, A., P. Renard., and D. Tainturier. 1998. A procedure for Poitoujackass sperm cryopreservation. Theriogenology; 50: 793- 806.
- Trimeche, A., J. M. Yvon., M. Vidament., E. Palmer., and M. Magistrini. 1999. Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-Thaw motility of stallion spermatozoa. Theriogenology; 52: 181– 191.
- Tuli, R. K., and W. Holtz. 1994. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post- Thaw survival and got- Release from Boer goat spermatozoa. Theriogenology; 42: 547– 555.
- Vertegen, J., M. Iguer- Ouada., and K. Onclin. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology; 57: 149-179.
- Yutaka, F., K. Hirohide., T. Tetsuro., H. Mami., and O. Kentaro. 2008. Fertility after insemination using a soybean-Based semen extender in sheep. J . Reproduction and Development; 54 (4): 286- 289.

Nº Ref:316