# تأثير محلول التمديد ودرجة حرارة الإذابة في مؤشرات السائل المنوي المُجمَّد للمعز الشامي

**د. عبد الغفار السلامة*** **د. محمد شلطف****


## الملخص

نُفِّذ هذا البحث على عشرة تيوس من المعز الشامي مخصصة للتلقيح الاصطناعي، بعمر 36±7 أشهر، وبمتوسط وزن 78±3 كيلوغرام، وذلك بهدف الحصول على السائل المنوي منها ودراسة أثر التراكيز المختلفة من الفيتامين B12 المُضاف إلى محاليل تمديد السائل المنوي، وإضافة إلى أثر درجة حرارة الإذابة في مؤشرات السائل المنوي المجمّد لتيوس المعز الشامي.

حُضّرت محاليل تمديد السائل المنوي وفق البروتوكول المعتمد، والمحتوية تراكيز مختلفة من الفيتامين B12 (0، 1، 2، 3، ملغ /مل)، عُبئ السائل المنوي الممدد في القشات (0.5 مل) وجُمّدت آلياً وخُزّنت في الآزوت السائل عند درجة حرارة −196°م لحين إجراء الاختبارات اللاحقة.

أُذيبت قشات السائل المنوي وفق درجات حرارة الإذابة المدروسة، وأجري للنطف اختبارات الحركية وحيوية وسلامة الغشاء البلازمي واختبار سلامة الجسيم الطرفي.

أظهرت النتائج وجود فروق معنوية (**P**<0.05) في أثر محاليل التمديد المُضاف إليها الفيتامين **B**12 على المؤشرات المدروسة، إذ لوحظ تفوق النطف المحفوظة في محلول التمديد الحاوي على (2 ملغ/ مل) من الفيتامين **B**12 في مؤشرات الحركة


* قسم علم الحياة الحيوانية– كلية العلوم– جامعة دمشق– سورية

** قسم الإنتاج الحيواني– كلية الزراعة– جامعة دمشق– سورية

العامة والحركة التقدمية ومؤشرات حيوية الغشاء البلازمي وسلامته وسلامة الجسيم الطرفي على تلك المحفوظة في بقية محاليل التمديد المدروسة والمحتوية على تراكيز مختلفة (0، 1، 3 ملغ /مل) من الفيتامين **B**12. وأظهرت النتائج تفوقاً معنوياً ($P<0.05$) للنطاف في السائل المنوي المذاب عند درجة الحرارة (37°م) للقشات المجمدة عن تلك المُذابة عند بقية درجات الحرارة (4°م و70°م)، وذلك في مؤشرات الحركة العامة والحركة التقدمية وسلامة الجسيم الطرفي.

خلصت الدراسة إلى أن إذابة السائل المنوي لتيوس المعز الشامي عند درجة حرارة (37°م) لمدة 30 ثانية حسنت من مؤشرات السائل المنوي بعد الإذابة، كما أن تضمين الفيتامين **B**12 وبتركيز 2ملغ/مل إلى محاليل تمديد السائل المنوي، قد حسّن وبشكل معنوي ($\mathbf{P}<0.05$) مؤشرات حركة وسلامة السائل المنوي بعد التجميد والإذابة.

**الكلمات المفتاحية:** السائل المنوي، المعز الشامي، الفيتامين **B**12، محلول التمديد، درجة حرارة الاذابة.

# Effect of extender and thawing temperature on parameters on frozen semen of Shami goat

**Dr. A. Ghffar ALsalama*** **Dr. Mohammad Shaltaf ****


## Abstract

This research was carried out on ten Shami goats intended for artificial insemination, with an age of 36 ± 7 months, and average weight of 78 ± 3 kg, With the aim of obtaining semen from them, and to study the effect of different concentrations of vitamin B12 added to semen extension solutions, and the effect of the thawing temperature in the frozen semen parameters of Shami goat.

Semen extenders were prepared according to the approved protocol, and contain different concentrations of vitamin B12 (0, 1, 2, 3, mg / ml), semen was filled in straws (0.5 ml) and frozen automatically and stored in liquid nitrogen at a temperature of -196ºC until subsequent tests are held.

The semen straws were thawed according to the studied thawing temperatures, and the sperms were subjected to tests of motility, viability and plasma membrane integrity and the acrosome integrity.

Our results showed significant differences ($P < 0.05$) in the effect of extenders added to vitamin B12 on the studied parameters. The superiority of the semen preserved in the extender containing (2 mg/ml) of vitamin B12 was observed in the motility, progressive motility, plasma membrane and acrosome integrity parameters over those preserved in the rest of the extenders studied and containing


* Department of Animal Biology - Faculty of Science - Damascus University – Syria.

** Department of Animal Production - Faculty of Agriculture - Damascus University – Syria.

different concentrations (0, 1, 3 mg/ml) of vitamin B12. The results showed a significant superiority (P <0.05) for semen thawing at the temperature (37 ° C) for the frozen straws than for the thawed at the rest of the temperatures (4 ° C and 70 ° C), in the indicators of motility, progressive motility and plasma membrane and acrosome integrity parameters.
In conclusion, that thawing the semen of the Shami goat at a temperature of (37 ° C) for 30 seconds improved the semen parameters after thawing, and the inclusion of vitamin B12 at a concentration of 2 mg / ml to the semen extender improved significantly (P < 0.05) in parameters of motility and integrity of semen after freezing and thawing.

**Key words:** Semen, shami goat, Vitamin B12, Extender, Thawing temperature.

**1- المقدمة:**

تؤدي محاليل تمديد السائل المنوي دوراً مهماً في نجاح عملية التلقيح الصنعي أو فشلها، وكذلك في تكاليفها، والمعروف أن محلول التمديد لا يزيد من خصوبة النطف، بل يحافظ عليها، ويطيل فترة حيويتها (سلهب وسلوم، 2010). أشارت بعض الدراسات إلى وجود تأثير إيجابي لإضافة الفيتامين B12 في حركة النطف وعددها، ويُعد الفيتامين B12 واحداً من الفيتامينات الذوابة في الماء والذي يعمل كمساعد أنزيمي لعدد من التفاعلات الكيميائية الحيوية كتخليق المثيونين واستقلاب الأحماض الأمينية متفرعة السلسلة (Branched amino acids) ومنها (ليوسين، آيزو ليوسين، ڤالين) (Juanchi *et al.*, 2000)، كما يعمل كمساعد أنزيمي للإنزيمات الضرورية لعمل الخلية، بما فيها استقلاب الـ DNA.

أشارت العديد من الدراسات إلى أن إضافة الفيتامين B12 يمكن أن يُحَسِّن من حركة نطف الخنازير والكباش (Ha and Zhao, 2003) والثيران (Cai et al., 2004) خلال عمليتي التجميد والإذابة.

يُعد معدل الإذابة عاملاً مهماً يؤثر في جودة السائل المنوي (Tuli et al., 1991)، يتم عادةً إذابة القشات المحتوية على السائل المنوي للمعز عند درجة حرارة 37°م في حمام مائي لمدة 12-30 ثانية (Cabrera et al., 2005)، في حين لوحظ وجود بروتوكول إذابة أبطأ عند درجة حرارة +5°م لمدة 2 دقيقة في حمام مائي ولكن بكفاءة أقل (Dika and Rao, 1987)، وضّح Tuli et al.(1991) أن الحركة التقدمية للسائل المنوي للمعز والمذاب عند درجة حرارة 70°م لمدة 7 ثانية كانت أعلى مقارنة بمعدل الإذابة عند الدرجة 37°م لمدة 2 دقيقة أو 40°م لمدة 20 ثانية.

أشار Lahnsteiner (2000) أن معدل الإذابة يُعد مؤشراً أكثر حساسية خلال عملية حفظ السائل المنوي بالبرودة، إذ أوصى بالقيام بالإذابة عند درجات حرارة

عالية لتجنب تكوّن البللورات الجليدية (Ice crystals)، لأن ضرر الإذابة يحدث عندما تمر النطف ضمن نطاق درجات الحرارة الحرجة −50 °م حتى−15°م أو−5°م، وبالمثل تتعرض النطف لضغط تناضحي عندما تكون مدة الإذابة غير كافية لتدفق واقيات البرودة الزائدة من الخلايا (cryoprotectant)، ومن ثمَّ تنتبج النطف وتتضرر (Andrabi, 2007).

أُستخدمت درجات حرارة مختلفة في بروتوكولات إذابة السائل المنوي للمعز من قبل العديد من الباحثين، إذ استخدمت درجات الحرارة 37°م، 40°م، 70°م، لمدة 2 دقيقة، 20 ثانية، 7 ثانية على التوالي (Tuli et al., 1991؛ Dika and Rao, 1987)، أو عند درجة حرارة 37°م لمدة 12−15 ثانية، 5°م لمدة 2 دقيقة، أو عند درجة حرارة 40°م لمدة 15 دقيقة (Khalifa and ELSaidy, 2008)، وقد لاحظ Dika and Rao (1987) أن الإذابة عند درجة حرارة 37°م قد أعطت نتائج أفضل فيما يخص مؤشرات حركة الجسيم الطرفي وسلامته مقارنة بالإذابة عند درجة حرارة 5°م، لذلك تُعد الإذابة عند درجة حرارة 37°م أكثر ملاءمة وخاصة فيما يتعلق بالشروط الحقلية.

هدفت الدراسة الحالية إلى تقييم دور فيتامين B12 في محاليل تمديد السائل المنوي، وكذلك تأثير درجة حرارة الإذابة في مؤشرات السائل المنوي المُجمَّد للمعز الشامي.

**2− مواد البحث وطرائقه:**

2−1− مداولة السائل المنوي:

نفذت هذه المرحلة في مختبر التلقيح الاصطناعي ونقل الأجنة في محطة بحوث أزرع بسورية (المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة) (ACSAD). جُمع السائل المنوي خلال الموسم التناسلي بوساطة المهبل الاصطناعي من عشرة تيوس معز شامي مخصّصة للتلقيح الاصطناعي

بعمر 7±36 أشهر وبمتوسط وزن 3±78 كيلوغرام، ومزجت قذفات الذكور بعد جمعها، ثم وزعت على محاليل التمديد المدروسة.

مُدِّد السائل المنوي لتيوس المعز الشامي بمحاليل التمديد بتركيز $150\times10^6$ نطفة/قشة.

حُضِّر محلول الشاهد Egg Yolk (EY) من 20% (حجم/حجم) من صفار البيض و6.4% (حجم/حجم) من الغليسرول واستكمل الحجم إلى 100 مل من محلول التمديد الأولي (Menger *et al.*, 1982) مع إضافة 0.1 غ/مل ستربتومايسين، و1000 وحدة دولية/مل من البنسلين. تم تحضير المحاليل التجريبية بإضافة تراكيز مختلفة من الفيتامين B12 (0، 1، 2، 3، ملغ /مل)، وضُبطت درجة الحموضة (pH) لجميع المحاليل للحصول على درجة حموضة 6.8 بإضافة حمض كلور الماء.

2-2- تجميد السائل المنوي:

نُقلت عينات السائل المنوي الممدد ووضعت مع القشات المخصصة لتعبئة السائل المنوي الممدد في حجرة التبريد في درجة حرارة +4° م لمدة 2.5 ساعة (فترة التوازن والتبريد)، عُبئ السائل المنوي الممدد في قشات (0.5 مل) مصنوعة من الكلوريد بوليفينيل (Polyvinyl chloride) إنتاج شركة( I. M. V, L Aigel, France) لتغلق آلياً داخل حجرة التبريد، ثم وضعت على حامل معدني خاص يتسع لـ 40 قشة، وتُركت في حجرة التبريد حتى نهاية عملية التعبئة والإغلاق لبقية القشات، خُفِّضت حرارة قشات السائل المنوي الممدد من 4°م إلى – 140°م خلال 4 دقائق باستخدام نظام التجميد الآلي (حاسب- منظم آلي- خزان سائل آزوتي مضغوط- حجرة تجميد)، ثم نُقلت إلى وعاء عازل من الستريوبور مملوء بالآزوت السائل، إذ تمت عملية التجميد النهائي للقشات عند درجة حرارة -196°م، ثم خزنت في خزانات الآزوت السائل المخصصة للتخزين.

2-3-تقدير حركية النطف مجهرياً:

نُفِّذ هذا الاختبار وما يليه من اختبارات في مخابر كلية العلوم بجامعة دمشق، قُيِّمت المؤشرات الحركية للنطف تحت المجهر الضوئي حيث أُذِيبت ثلاث قشات في كل يوم عمل بحسب درجة حرارة الإذابة المدروسة وبعد حضنها لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة 37°م، أُخِذَت عينة 5 ميكروليتر من السائل المنوي ووُضِعَت على طرف الساترة ضمن شريحة الزجاجية المُدَفَّأة عند درجة حرارة 37°م، تم تقدير مؤشرات الحركة العامة والحركة التقدمية مجهرياً.

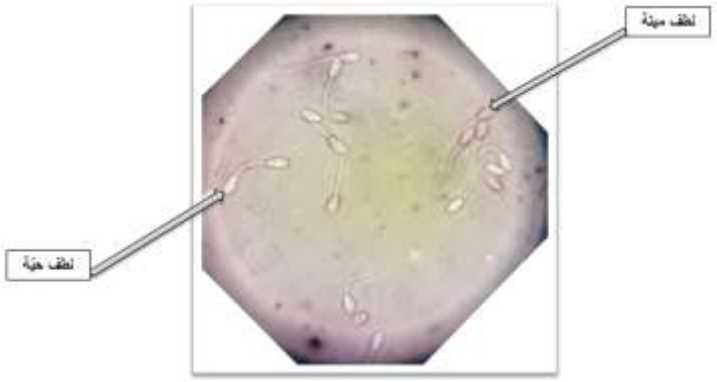
2-4-اختبار سلامة الغشاء البلازمي HOS-t:

أُجري هذا الاختبار لتقييم سلامة الغشاء البلازمي وذلك بعد خلط 50 ميكروليتر من السائل المنوي بعد الإذابة في 1 مل من محلول منخفض الضغط الحلولي (100 ميلي أوزمول) (المكون من سترات الصوديوم والفركتوز) وحضنه عند درجة حرارة 37°م لمدة 45 دقيقة (Garcia-Lopez *et al.*, 1996)، فُحِص 15 ميكروليتر من خليط العينة على شريحة مدفأة 37مْ ومغطاة بساترة تحت المجهر الضوئي بدرجة تكبير (X400)، تم عد 300 نطفة من كل شريحة وصنفت إلى سليمة أو غير سليمة اعتماداً على وجود التفاف في الذيل من عدمه.

2-5-اختبار حيوية النطف (أيوزين- نيغروسين):

استخدم هذا الاختبار وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل Bearden and Fuquay (1992) لتقدير حيوية النطف بعد عملية التجميد والإذابة، إذ يتم من خلاله تحديد نسبتي النطف الحية والميتة، استخدم لهذا الاختبار صبغات تلوين قياسية (أيوزين- نيغروسين) لها القدرة على عبور الأغشية الخلوية للنطف الميتة وصباغتها باللون الأحمر الفاتح (لون الأيوزين)، بينما تتلون أرضية المحضر (الشريحة الزجاجية) بلون أزرق (نيغروسين)، وتظهر النطف الميتة تحت المجهر الضوئي بالتكبير

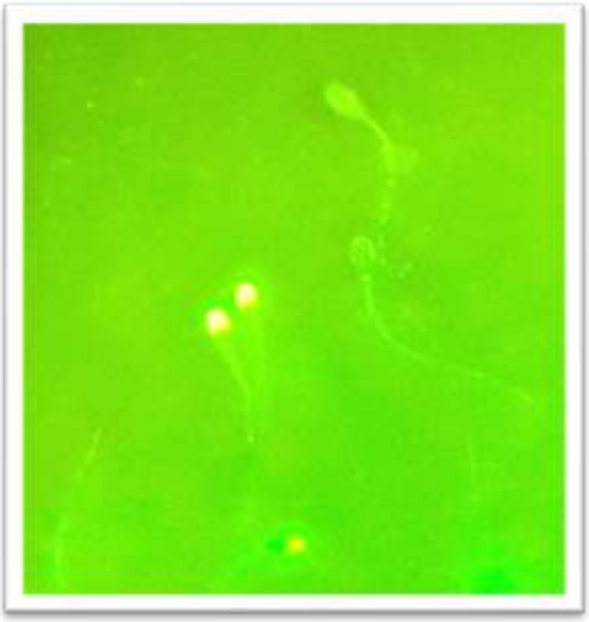
X400 ملطخة باللون الوردي بخلاف الحية التي تبقى شفافة، وقُدِّرت على أساس ذلك نسبة الحيوية في محاليل التمديد المدروسة.




**2-5-اختبار سلامة الجسيم الطرفي (FITC-PNA):**

أُجري هذا الاختبار لتحديد المقدرة الإخصابية مخبرياً للنطف المجمدة والمذابة باستخدام اختبار ( Fluorescein Isothiocyanate - conjugated peanut agglutinin) FITC- PNA وذلك وفق مراحل متسلسلة ( **Mendoza *et al.*, 1992**)، أُخذت عينات من السائل المنوي بعد الإذابة والتي تم تحضيرها وفق مراحل متسلسلة تضمنت غسيل النطف وشل حركتها وتجهيزها للصبغ بـ 20 ميكروليتر من راصة الفول السوداني PNA (50 ملغ/مل) وحضِنت بعدها في مكان مظلم وعند درجة حرارة البراد +4°م لمدة 15 دقيقة، وفحصت بعدها تحت مجهر الفلّورة بطول موجة 430 نانو متر، حيث تم تمييز نوعين من النطف:

- النطف ذات الجسيم الطرفي السليم والذي يبدي تألقاً باللون الأخضر تحت مجهر الفلّورة.
- النطف ذات الجسيم الطرفي المتضرر والذي لا يبدي تألقاً تحت مجهر الفلّورة.



**2-6-التحليل الإحصائي Statistical Analysis:**

خضعت النتائج التي تم الحصول عليها للتحليل الإحصائي وفقاً لتحليل التباين العاملي (3*4: درجة حرارة الإذابة* تركيز الفيتامين B12)، وأُجري اختبار ANOVA باستخدام برنامج SPSS V.17. وعند ظهور فروق ذات دلالة إحصائية بين المؤشرات المدروسة، تم حساب أقل فرق معنوي L.S.D.

- **النتائج والمناقشة:**

تُظهر النتائج والمبينة في الجدول (1) وجود فروق معنوية (**P**<0.05) بين محاليل التمديد المعتمدة بدراستنا هذه في أثرها في المؤشرات المدروسة، إذ لوحظ تفوق محلول التمديد المحتوي على (2 ملغ/ مل) من الفيتامين **B**12 في مؤشرات الحركة العامة والحركة التقدمية ومؤشرات حيوية الغشاء البلازمي وسلامته وسلامة الجسيم الطرفي على بقية محاليل التمديد المدروسة والمحتوية على تراكيز مختلفة (0، 1، 3 ملغ /مل) من الفيتامين **B**12.

**الجدول (1) تأثير إضافة الفيتامين B12 إلى محاليل التمديد ودرجة حرارة الإذابة على متوسطات حركة وسرعة النطف ومؤشرات سلامة النطف بعد التجميد والإذابة**

| المؤشر | تركيز الفيتامين B12 في محلول التمديد | | | | P | LSD | | درجة حرارة الإذابة | | | P | LSD | | قيمة P للتداخل |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 ملغ/مل | 1 ملغ/ مل | 2 ملغ/ مل | 3 ملغ/ مل | | 5 % | 1 % | 4م° | 37م° | 70م° | | 5% | 1% | |
| الحركة العامة% | $^{a}$54.50 | $^{a}$55.67 | $^{b}$62.83 | $^{a}$54.50 | 0.000 | 2.04 | 2.69 | $^{a}$57.13 | $^{a}$58.63 | $^{b}$54.88 | 0.000 | 1.76 | 2.33 | 0.000 |
| الحركة التقدمية % | $^{a}$12.60 | $^{ab}$13.30 | $^{b}$20.87 | $^{c}$14.08 | 0.000 | 1.48 | 1.96 | $^{a}$13.55 | $^{b}$18.00 | $^{a}$14.08 | 0.000 | 1.28 | 1.70 | 0.000 |
| سلامة الغشاء البلازمي % | $^{a}$56.00 | $^{a}$56.33 | $^{b}$63.13 | $^{a}$56.10 | 0.000 | 1.96 | 2.59 | $^{a}$58.63 | $^{a}$59.18 | $^{b}$55.88 | 0.000 | 1.70 | 2.24 | 0.000 |
| حيوية النطف % | $^{a}$57.33 | $^{a}$57.67 | $^{b}$64.47 | $^{a}$56.53 | 0.000 | 2.10 | 2.77 | $^{a}$59.23 | $^{a}$60.78 | $^{b}$57.00 | 0.000 | 2.10 | 2.77 | 0.001 |
| سلامة الجسيم الطرفي % | $^{a}$32.50 | $^{b}$35.57 | $^{c}$42.47 | $^{a}$33.77 | 0.000 | 1.68 | 2.23 | $^{a}$34.35 | $^{b}$38.93 | $^{a}$34.95 | 0.000 | 1.46 | 1.93 | 0.466 |

- تشير الأحرف المختلفة ضمن السطر الواحد إلى فروق معنوية (P<0.05) بين المحاليل المدروسة والمذابة بدرجات حرارة مختلفة

كما لوحظ وجود فروق معنوية ($P<0.05$) في المؤشرات المدروسة بين مختلف درجات حرارة الإذابة، حيث لوحظ تفوق معنوي ($P<0.05$) لدرجة حرارة الإذابة (37°م) على بقية درجات حرارة الاذابة في مؤشري الحركة العامة والحركة التقدمية ومؤشرات سلامة الجسيم الطرفي.

تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما وجده Hamedani *et al.*(2013) و Asadpuor *et al.* (2012) بأن إضافة 2 ملغ/مل من الفيتامين B12 لمحلول تمديد السائل المنوي للكباش حسّن من حركة النطف وحيويتها وسلامة الغشاء البلازمي، إلا أن نتائج هذه الدراسة تفوّقت في قيم المؤشرات المدروسة عما توصل إليه Hamedani *et al.* (2013) عند إضافة الفيتامين B12 لمحلول تمديد السائل المنوي وتجميده لأغنام Dallagh إذ بلغت القيم التي توصل إليها في مؤشرات الحركة العامة، والحركة التقدّمية، والحيويّة (32%، 28% 38 على التوالي).

وأفاد Hu *et al.* (2009) بأن نوعيّة السائل المنوي المُجَمَّد للثيران المضاف إليه 2.5 ملغ/مل من الفيتامين B12 تَحَسَّنت خلال مرحلة ما بعد الإذابة، وبلغت قيّم مؤشرات الحركة العامة (53.67%)، بالإضافة إلى تفوّقه في مؤشري سلامة الجسيم الطرفي والغشاء البلازمي للنطف على بقيّة التراكيز المدروسة.

بيّن Cai *et al.* (2004) أن الفيتامين B12 يُحّسن حركة نطف الثيران خلال عمليتي التجميد والإذابة، وأن إضافته بنسبة (0.5%، حجم/حجم) إلى محلول التمديد حسّن بشكل كبير من نوعيّة السائل المنوي. ومن ثمَّ فإن هذا التحسُّن في نوعيّة السائل المنوي بعد عمليتي التجميد والإذابة يؤدي إلى زيادة معدل الخصوبة الحقلية، وتشير الدراسات إلى وجود ارتباط بين عدد النطف سليمة الغشاء البلازمي والنطف التي تجتاز مرحلة اكتساب القدرة Capacitation.

بناءً على التراكيز المدروسة، وُجدت تأثيرات إيجابية وبعضها ذو تأثيرات ضعيفة لإضافة الفيتامين B12، حيث إن إضافة الفيتامين B12 بتركيز 2 ملغ/ مل سبب

زيادة معنوية في المؤشرات المدروسة للسائل المنوي للمعز الشامي مقارنة بالتراكيز الأخرى المدروسة.

تسبب كلٌ من عمليتي التجميد والإذابة تغيّرات هائلة في ماء الخلية، ومن المعروف أن النطف تتخلّص من معظم السيتوبلازم خلال المراحل الأخيرة من التمايز، ويُفقد المُكَوِّن البلازمي المهم المحتوي على مضادات الأكسدة والتي تقاوم التأثير الضار لأنواع الأكسجين التفاعلي والأكسدة الليبيدية (Atessahin *et al.*, 2008)، ولذلك تكون النطف عرضة لإجهاد الأكسدة الليبيدية Lipid Peroxidation Oxidative (LPO) خلال عمليتي الحفظ بالبرودة والإذابة. ومع ذلك قد تكون القدرة المضادة للأكسدة للسائل المنوي غير كافية لمنع الأكسدة الليبيدية خلال عمليتي التجميد والإذابة.

لقد بيّن Hu *et al.* (2009) أنه من المحتمل أن تكون الزيادة في حركة وحيويّة وسلامة الغشاء البلازمي للنطف مرتبط بزيادة مُحتوى البلازما المنوية من إنزيم الغلوتاثيون بيروكسيداز GSH-px (Glutathione peroxidase)، وهذا يتوافق مع النتائج التي توصل إليها Vezina *et al.* (1996) عند البشر، إذ إن إضافة الفيتامين B12 لأوساط تمديد السائل المنوي قد زادت من نشاط مضادات الأكسدة بسبب زيادة نشاط الغلوتاثيون بيروكسيداز GSH-px والتي تُؤَمِّن الحماية ضد أكسدة الدهون التلقائية، ولقد أشار ALVarez and Storey (1984) إلى أن الأكسدة التلقائية لدهون الغشاء البلازمي تُفْقِدُه القدرة على العمل كحاجز نفوذ، مما يؤدي إلى فقدان أنزيمات وركائز العصارة الخلوية، ومن ثمَّ انخفاض حركة ومعدل بقاء النطف.

كما تَوَصَّل Asadpour *et al.* (2012) إلى أن إضافة الفيتامين B12 إلى أوساط الحفظ بالبرودة قد أدّت إلى زيادة تركيز سوبر أكسيد ديسموتاز SOD (Superoxide dismutase) في محلول التمديد المحتوي على 2 ملغ/مل

من الفيتامين B12، والغلوتاثيون بيروكسيداز في السائل المنوي للكباش المُمَدَّد في محلولي التمديد المحتويين على 2 و3 ملغ/ مل من الفيتامين B12، وتناقضت هذه النتيجة مع معطيات Hu *et al.* (2011) والذي أفاد بأن نشاط GSH-px قد انخفض بشكل ملحوظ في محلول تمديد السائل المنوي للثيران المضاف إليه 2.5 ملغ/ مل من الفيتامين B12.

أشار Ha and Zhao (2003) إلى أن انبعاث الغلوتاميك أوكزالو أسيتيك ترانس أميناز (Glutamic oxaloacetic transaminase) (GOT) في البلازما المنوية للكباش قد انخفض بشكل ملحوظ لدى إضافة الفيتامين B12 إلى محلول تمديد السائل المنوي، وقد يؤدي هذا دوراً مهماً في تحسين حركة النطف خلال الحفظ بالتبريد، كما أوضح Neild *et al.* (2003) أن (GOT) يتحرر في البلازما المنوية خلال عمليتي التبريد والتجميد، مما يؤدي إلى تضرر الجسيم الطرفي للنطف.

إن إضافة B12 إلى محاليل التمديد يمنع توليد الأشكال النشطة من الأكسجين منها ($H_2O_2$، $O_2$، OH، وغيرها) التي تعمل على أكسدة الدهون، و من ثمَّ يُقَلِّل من تَشَكُّل أنواع الأكسجين التفاعلي ROS، ويقلّل من الآثار الضارة للحفظ بالبرودة ويُحسّن من سلامة الغشاء البلازمي والجسيم الطرفي للنطف بعد الإذابة (Hu *et al.*, 2011). وأكد Yufan (1998) أن إضافة الفيتامين B12 إلى محلول تمديد السائل المنوي للثيران تؤدي إلى تَحَسُّن في نشاط النطف، وتُقَلِّل من معدل النطف المشوهة ونشاط GOT بشكل ملحوظ. كما تَبَيَّن أن إضافة الفيتامين B12 يمكن أن يحمي النطف من الأضرار البنيوية خلال عملية التجميد (Hamedani *et al.*, 2013)، وأظهرت نتائج هذه الدراسة أن الزيادة المُفْرِطَة لفيتامين B12 لا تُحَسِّن من حركة نطف ذكور المعز الشامي بعد الإذابة.

وقد أكد Hu *et al.* (2011) أن استخدام تراكيز مرتفعة من الفيتامين B12 بدءاً من تركيز (3.75 ملغ /مل) يؤدي إلى تأثيرات سمية في نطف الثيران، إذ إن الإضافة المُفْرِطَة من الفيتامين B12 يمكن أن تُجَنِّب الإجهاد التأكسدي الناجم عن التشكيل المُفْرِط لأنواع الأكسجين التفاعلي ROS، ولكنها قد تُؤَدّي أيضاً إلى إيقاف الوظائف الحيويّة الطبيعية المرتبطة بـ ROS.

إن التَحَسُّن في مؤشرات السائل المنوي للمعز الشامي بعد عمليتي التجميد والإذابة باستخدام محاليل تمديد مُضاف إليها تراكيز مختلفة من الفيتامين B12 كان تَحَسُّناً نسبياً، حيث أظهرت التراكيز المرتفعة منه (3 ملغ/ مل) تأثيراً غير مجدٍ في مؤشرات حركة النطف وسلامتها بعد التجميد والإذابة، ولكن إضافة الفيتامين B12 بالتراكيز المناسبة (2 ملغ/ مل نتيجة هذه الدراسة) قد حسّنت من حركة النطف بالإضافة إلى تحسين مستوى سلامة النطف، وأمّنت حماية النطف من الإجهاد التأكسدي، وقد يُعزى ذلك إلى أهمية الفيتامين B12 في فيزيولوجيا النطف.

إذ إن زيادة سرعة الاذابة تعمل على الحد من تكون البلورات الجليدية داخل الخلايا والتي تؤدي إلى تضرر الميتوكوندريا (Courtens and Paqulguen, 1985).

وتجدر الإشارة إلى أن معدل الإذابة يُعد مؤشراً مهماً خلال عملية حفظ السائل المنوي بالبرودة، إذ أوصى الباحثون بإذابة السائل المنوي بدرجات حرارة عالية لتجنب تكوّن البلورات الجليدية، وذلك لأن ضرر الإذابة للنطف يحدث ضمن نطاق درجات الحرارة الحرجة (−50م° حتى −15م° أو حتى −5م°).

ولقد أشار Bezerra *et al.*(2012) إلى أن رفع درجة حرارة الإذابة من 37°م الى 55°م لا يؤثر في جودة السائل المنوي للمعز، ومع ذلك لا بد من الاهتمام بدرجة حرارة الإذابة والفترة الزمنية التي تتعرض لها النطف في فترة الإذابة، و من ثمَّ تصبح هذه العملية أكثر أهمية مع ارتفاع درجة حرارة الاذابة عن 37°م، كما أن درجات حرارة الإذابة العالية يمكن أن تؤدي إلى موت النُّطَفِ إذا كانت عملية الإذابة غير

ملائمة ودقيقة، ولذلك فإن درجة حرارة الإذابة للنطف (37م°) تُعد أكثر ملاءمة في ظل ظروف التلقيح الطبيعي، ويكون خطر ارتفاع درجات حرارة الإذابة بالحدود الدنيا.

**خامساً– الاستنتاجات:**

- إن إضافة الفيتامين B12 بتراكيز مناسبة (2 ملغ/ مل) إلى محاليل تمديد السائل المنوي قد حسّن من مؤشرات حركة وسلامة السائل المنوي للمعز الشامي بعد التجميد والإذابة.
- إن إذابة السائل المنوي للمعز الشامي عند درجة حرارة 37°م لمدة 30 ثانية تعد مناسبة وتؤدي إلى تحسين في جودته ونتائجه.

**التوصيات:**

- استكمال الأبحاث حول دور مضادات الأكسدة في حماية النطف خلال عمليتي التجميد والإذابة، وتحديد الدور الحيوي الدقيق الذي من خلاله تؤمن حماية النطف من الإجهاد التأكسدي.

**المراجع:**

1. سلهب، سليمان وسلوم، عبير. (2010). فيزيولوجيا التناسل في الحيوانات الزراعية– القسم العملي. جامعة دمشق– سورية.

2. Alvarez, J.G. and Storey, B.T., 1984. Assessment of cell damage caused by spontaneous lipid peroxidation in rabbit spermatozoa. *Biology of reproduction*, *30*(2), pp.323-331.
3. ANDRABI, S.M.H. 2007. Fundamental principles of cryopreservation of Bos taurus and Bos indicus bull spermatozoa. International Journal of Agriculture and Biology, v.9, n.2, p.367-369.
4. Asadpour, R., Pourseif, M.M., Moghadam, G., Jafari, R., Tayefi, H. and Mahmodi, H., 2012. Effect of vitamin B12 addition to extenders on some physicochemical parameters of semen in crossbred rams. *African Journal of Biotechnology*, *11*(54), pp.11741-11745.
5. Atessahin, A., Bucak, M.N., Tuncer, P.B. and Kızıl, M., 2008. Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze–thawing process. *Small Ruminant Research*, *77*(1), pp.38-44.
6. Bearden, H. J. and J. W. Fuquay., 1992. Applied Animal Reproduction. 3rd Ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
7. Bezerra, F.S.B., Castelo, T.D.S., Santos, É.A.A.D., Dantas, T.D.C., Simão, B.R. and Silva, A.R., 2012. Assessment of the interaction between straw size and thawing rate and its impact on in vitro quality of post-thaw goat semen. Revista Brasileira de Zootecnia, 41(3), pp.592-597.
8. Cabrera, F., Gonzalez, F., Batista, M., Calero, P., Medrano, A. and Gracia, A., 2005. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary buck (Capra hircus). Reproduction in domestic animals, 40 (3), pp.191-195.
9. Cai, J.G., Sun, S.Q., Wang, L.G. and Gu, H.J., 2004. The effect of adding vitamin B12 in sperm diluter on quality of bull's straw frozen sperm. *J. Liaoning Agricult. Coll*, *6*, pp.10-11.

10. Courtens, J.L., Paquignon, M., 1985. Ultrastructure of fresh, frozen and frozen-thawed spermatozoa of the boar. In: Johnson, L.A., Larsson, K. (Eds.), Deep Freezing of Boar Semen. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, pp. 61–87.
11. Deka, B.B. and Rao, A.R., 1987. Effect of extenders and thawing methods on post thawing preservation of goat semen. *Indian Veterinary Journal*, *64*(7), pp.591-594.
12. Garcia-Lopez, Z., M. Ollero, T. Muino-Blanco and J. A. Cebrian-Perez., 1996. A dextran swim-up procedure for separation of highly motile and viable ram spermatozoa from semen plasma. Theriogenol. 46:141-151.
13. Ha, F. and Zhao, Y.Z., 2003. Vitamin B complex as a complement in the thawing dilutions of the ram semen. *China Herbivores*, *23*, pp.19-20.
14. Hamedani, M.A., Tahmasbi, A.M. and Ahangari, Y.J., 2013. Effects of vitamin B 12 supplementation on the quality of ovine spermatozoa. *Open veterinary journal*, *3*(2), pp.140-144.
15. HU, J.H., LI, Q.W., Chen, Y.L., JIANG, Z.L., JIA, Y.H., WANG, L.Q. and OU, B.B., 2009. Effects of addition of vitamin B_ {12} to the extender on post-thaw motility, acrosome morphology, and plasma membrane integrity in bull semen. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, *33*(5), pp.379-384.
16. Hu, J.H., Tian, W.Q., Zhao, X.L., Zan, L.S., Xin, Y.P. and Li, Q.W., 2011. The cryoprotective effects of vitamin B12 supplementation on bovine semen quality. *Reproduction in domestic animals*, *46*(1), pp.66-73.
17. Juanchi, X., Albarran, G. and Negron-Mendoza, A., 2000. Radiolysis of cyanocobalamin (vitamin B12). *Radiation Physics and Chemistry*, *57*(3-6), pp.337-339.
18. Khalifa, T.A.A., Lymberopoulos, A.G. and El-Saidy, B.E., 2008. Testing usability of butylated hydroxytoluene in conservation of goat semen. Reproduction in domestic animals, 43(5), pp.525-530.

19. Lahnsteiner, F. 2000. Semen cryopreservation in the salmonidae and in the northern pike. Aquaculture Research v.31, n.3, p.245-258.
20. Mendoza, C., Carreras, A., Moos, J. and Tesarik, J., 1992. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using Pisum sativum agglutinin. Reproduction, 95(3), pp.755-763.
21. Menger, H., G. Brückner, and L. Neubert., 1982. *In-vitro* und *in-vivo* Untersuchungenzur Tieftemperatur Konservierung von Schafbocksperma. Arch. Exp. Vet. Med. 36:151-157.
22. Neild, D.M., Gadella, B.M., Chaves, M.G., Miragaya, M.H., Colenbrander, B. and Agüero, A., 2003. Membrane changes during different stages of a freeze–thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*, *59*(8), pp.1693-1705.
23. Tuli, R.K., Schmidt-Baulain, R. and Holtz, W., 1991. Influence of thawing temperature on viability and release of glutamic oxaloacetic transaminase in frozen semen from Boer goats. *Animal Reproduction Science*, *25*(2), pp.125-131.
24. Vezina, D., Mauffette, F., Roberts, K.D. and Bleau, G., 1996. Selenium-vitamin E supplementation in infertile men. *Biological Trace Element Research*, *53*(1-3), pp.65-83.
25. Yufan, L., 1998. The effects of vitamin B12 on the quality of freezing bull semen sperm. J. Hebei Normal University Sci. Technol.
http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-HBNS801.009.htm

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق 2020/08/17.
تاريخ قبوله للنشر 2020/09/29 .