دراسة مقارنة بين تقييم الخلايا النطفية لعينات السائل المنوي الطازجة مجهريا و جزيئيا باستخدام أختبار المذنب المتعادل (Natural Comet Assay) في الكباش العواسية

هيام عبد العظيم الحسيني تحرير الثويني إسماعيل كاظم

كلية الزراعة –جامعة القاسم الخضراء

Tahreermohammed@ymail.com

الخلاصة

أُجريت هذه الدراسة في كلية الزراعة / جامعة القاسم الخضراء للفترة من 1/9/2014 ولغاية 28/5/2015 على عشرة كباش عواسية تم تدريبها على جمع السائل المنوي بواسطة المهبل الإصطناعي إلا أن سبعة منها لم تظهر إستجابة على ذلك و التي أظهرت إستجابة هي ثلاثة فقط , غذيت هذه الأغنام على العلف المركز بالإضافة الى الرعي الحر .هدفت الدراسة الحالية الى دراسة مقارنة بين تقييم الخلايا النطفية لعينات السائل المنوي الطازجة مجهريا وجزيئيا باستخدام أختبار المذنب المتعادل (Natural Comet Assay) في الكباش العواسية .وأستخدم في هذه الدراسة ثلاثون قذفة منوية حيث تم تقييمها مجهريا و عشرة من هذه القذفات أستخدمت في الجزء الوراثي لتقييمها جزيئيا و مقارنة العينات المقيمة مجهريا بالعينات المقيمة جزيئا من خلال تقييم سلامة DNA الخلايا النطفية و أظهرت الدراسة الحالية ما يأتي

أظهرت نتائج الدراسة المعتمدة على قياسات معدل طول ذيل المذنب (Tail length) ومعدل النسبة المئوية ل DNA في الذيل (DNA% in tail)و معدل تعقب لحظة الذيل (DNA Moment) تأثير معنوي على مستوى ($p\leq 0.05$) في معدل تضرر DNAالخلايا النطفية لعينات السائل المنوي الطازجة في الكباش العواسية .

–هناك علاقة سالبة بين تقييم السائل المنوي مجهريا و بين تقييمه جزيئيا بإستخدام إختبار المذنب المتعادل (Natural Comet Assay) .

يستنتج من هذه الدراسة إن التقييم المجهري يعطي فكرة أولية عن نوعية الخلايا النطفية لعينات السائل المنوي في الكباش العواسية ولكنه لا يعطي تقييم دقيق عن مستوى تضرر DNA الحاصل في الخلايا النطفية لعينات السائل المنوي الطازجة لذلك لا بد من إجراء تقييم دقيق أكثر دقة على المستوى الجزيئي .

الكلمات المفتاحية :السائل المنوي،اختبار المذنب المتعادل،الاغنام .

Abstract

This study was conducted at College of Agriculture / AL-Qasim Green University for the period from 1/9/2014 and up to 28/5/2015 on Al-awassi rams trained to semen collection artificial vagina but that seven of them did not show a response to that, and that showed in response is only three , These rams were fed on fodder center in addition to the free grazing. The aim of the present study was to study a comparison between sperm cells assessment from the fresh semen samples microscopically and Molecularly by using Neutral comet assay of Awassi Rams. And used in this study Thirty ejections has been evaluated microscopically and ten of these ejections were used in part genetic and evaluated molecular samples compared to samples evaluated microscopically resident molecule through the evaluation of DNA damage of sperm cells and the results of the current study showed the following:.

The results of the current study, based on measurements of the (rate of comet tail length) and (the rate of DNA% in tail) and (the rate of DNA moment) significant effect on the level of ($P \leq 0.05$) in damage to DNA sperm cells rate for fresh semen samples in Al-awassi rams.

There is a positive direct correlation between microscopically semen assessment and molecularly using (Natural Comet Assay.)

We conclude from this study that the microscopic assessment gives an initial idea of the level of DNA damage a quotient in sperm cells to fresh semen samples.

Keywords:Semen,Natural comet assay,sheep.

المقدمة

يتم تشخيص العقم عند الذكور عن طريق التقييم المجهري من حيث التركيز و حركة وشكل الخلايا النطفية وغيرها من معايير السائل المنوي في القذفة المنوية الواحدة و هذه الاختبارات ضرورية لتوفير المعلومات الاساسية لنوعية الخلايا النطفية Gonzn و جماعته.(2012 ,

أقترح في الوقت الحاضر تقييم سلامة DNA الخلايا النطفية كعلامة مستقلة للخصوبة في الذكور Gonzalez-Marín)و جماعته , (2012 ., حيث توجد اختبارات مختلفة عدة متاحة لتقييم سلامة DNA الخلايا النطفية مثل تحليل تركيب كروماتين النطفة (SCSA) (sperm chromatin structure assay) و ختبار (TUNEL)و اختبار موقع ترجمة الشق (NT) (Situ nick translation) و اختبار تقييم تحليل السائل المنوي بالحاسوب ,(CASA) (Computer Assisted Semen Analysis) واختبار أكريدين البرتقال (AO) (Acridine Orange) و أختبار المذنب . (Langdon , 2012) (Comet Assay) و يعد اختبار المذنب (Comet assay) الذي يسمى ايضا (اختبار الترحيل الكهربائي لهلام الخلية المفردة (single–cell gel electrophoresis) من أدق الاختبارات نسبيا للكشف عن تضرر DNA في الخلايا المفردة , ويتضمن هذا الاختبار خطوة الترحيل الكهربائي للتمييز بين DNA السليم و التحطم الحاصل في أشرطة DNA المفردة أو المزدوجة (González-Marinو جماعته2012) .

وانسجاما مع التطورات الحاصلة في مجال الوراثة الجزيئية , لهذا جاء الهدف من هذه الدراسة هو لمقارنة الخلايا النطفية لعينات السائل المنوي الطازجة في الكباش العواسية مجهريا و جزيئيا و ملاحظة الفروقات بينهما.

المواد و طرائق العمل

أجريت هذه التجربة في مختبر التقانات الأحيائية في قسم الثروة الحيوانية / كلية الزراعة / جامعة القاسم الخضراء , للفترة من 2014 / 9 /1 و لغاية 2015 / 5 / 28 على عشرة كباش عواسية تم تدريبها على جمع السائل المنوي باستعمال المهبل الاصطناعي إلا ان سبعةً منها لم تظهر إستجابة على ذلك و التي أظهرتْ إستجابة هي ثلاثة أغنام فقط حيث أستخدمت الحيوانات التي اعطت نوعية سائل منوي جيدة في الجزء الوراثي.

الجزء الفسلجي Physiology Part فتضمن.:

1- جمع السائل المنوي Semen Collection

جُمعتْ عينات السائل المنوي من الاغنام العواسية الساعة التاسعة صباحا يومي (الاحد و الاربعاء) من كل أسبوع بواسطة المهبل الاصطناعي (AV) (Artificial Vagaina) و ذلك بعد تنظيف ساحة الجمع وحصر الحيوان بحصاره حديدية و تنظيف الحيوان المراد الجمع منه وذلك من خلال تنظيف منطقة الجمع وأزاله الصوف الذي بالقرب من هذه المنطقة.

بالإضافة الى تنظيف المهبل الاصطناعي و تعقيمه بالماء المقطر و تجفيفه و بعد عملية الجمع وضعت القذفة المجموعة في انبوبة معقمة و مدرجة ثم نقلت الى المختبر بدرة حرارة37 مْ . وبعد عملية الجمع قُيمتْ عينات السائل المنوي بالعين المجردة كماً (الحجم) و نوعاً (اللون)حيث تم قراءة حجم القذفة المجموعة من خلال أنبوبة التجميع المدرجة (collection Tupe) حيث كانت معظم القذفات المجموعة تتراوح بين (3-1.5مل) .

أما التقييم النوعي(اللون) فكان لون معظم القذفات المجموعة تتدرج من اللون القشدي (cream) الى اللون الحليبي (milky) وبعضها ذات لون مائي أخذت العينات ذات اللون القشدي واللون الأبيض .(عجام و جماعته، 1990.).

2-التقييم المجهري Microscope Assessment

أ -الحركة الجماعية و الحركة الفردية .: Sperm Movement

أخذت قطرة من كل قذفة منوية ووضِعَتْ على شريحة زجاجية دافئة موضوعة مسبقا في حاضنة كهربائية درجة حرارتها37 مْ ثم وضِعَتْ الشريحة على مسرح المجهر . وضِعَتْ الشريحة تحت قوة تكبير (10x) لغرض ملاحظة الحركة الجماعية للنطف فلوحِظَتْ ظهور حركة تموجيه ذات أقواس بعضها بنية و أخرى داكنة . ثم وضِعَتْ نفس الشريحة تحت قوة تكبير (40x) لغرض ملاحظة الحركة الفردية للنطف فلوحِظَتْ بعض النطف تتحرك بشكل متذبذب والبعض الاخر تتحرك بشكل متقدم نحو الامام) (السعدي، 1982).

ب -التركيز .: Sperm Concentration

تم فحص تركيز النطف بطريقة العد المباشرة و ذلك باستعمال جهاز الهيموسايتومتر حيث تم تنظيف جهاز الهيموسايتومتر و تجفيفه ووضِعَ على مسرح المجهر و ثبتت الشريحة الزجاجية الخاصة به على تقسيم المربعات ثم تم تحضير محلول التخفيف المكون من محلول ملحي فسيولوجي (0.09%) كلوريد الصوديوم النقية و أضيف اليها (0.01%) من محلول كلوريد الزئبق . بعد ذلك صُبِغَ المحلول ببضع قطرات من صبغة الأيوسين نكروسين و الغرض من محلول التخفيف هذا هو لإيقاف حركة النطف اما الغرض من اضافة قطرات من صبغة الأيوسين لمحلول التخفيف هو لتمييز النطف و عدها بسهولة , ثم خُفِفَتْ عينات السائل المنوي بمحلول الملح الفسيولوجي حيث أضيف لكل (0.1سم3) من عينة السائل المنوي(20سم 3) من محلول الملح الفسيولوجي و يخلط جيدا حتى يتجانس و بهذا تكون نسبة تخفيف السائل المنوي(1الى 200)و بواسطة الخاصية الشعرية اسُتعْمِلَ قضيب زجاجي لوضع قطرة من عينة السائل المنوي المخفف في الاخدود الوسطي للجهاز بالقرب من حافة اتصال غطاء الشريحة لكي يسمح للسائل المنوي بالانتشار تحت غطاء الشريحة و على مربعات التقسيم و بعد مرور فترة 5) دقائق (تم عد النطف الواقعة ضمن خمس مربعات كبيرة في أركان التقسيم و الوسط و بما أن كل مربع كبير يحتوي على(16مربع صغير) فهذا يعني تم عد النطف الموجودة ضمن (80مربع صغير) (عجام و جماعته،1990) و بعد اكمال عملية العد المباشر أجرينا العملية الحسابية الأتية الخاصة بالتركيز.:

التركيز = معدل عدد الحيامن في المربع الصغير × حجم المربع الصغير × 1/نسبة التخفيف1/

ج -شكل النطف .: Sperm Form

بعد أن وِضعَتْ العينات تحت قوة تكبير (40x) لغرض رؤية الحركة الفردية للنطف ولوحِظتْ ايضا شكل الخلايا النطفية الطبيعية حيت تمتاز أكثر الخلايا النطفية الطبيعية برأس بيضوي الشكل و مسطح الوجهين تعلوها قلنسوة تسمى الجسيم الطرفي و ذيل يشبه السوط و يتوسط الرأس و الذيل منطقة العنق(السعدي1982) .

د -الحيوية(عدد الحيامن الحية و الميتة) Sperm Vitality :-

صُبِغت أكثر العينات بصبغة الأيوسين – نكروسين بتركيز 5% ثم حُسِبتْ عدد النطف التي لم تُصبغْ لأن ذلك يدل على بقائها على قيد الحياة أم المتصبغة فذلك يدل على موتها ,العينات التي كانت حيويتها لا تقل عن 75% تم اخذها لإجراء الفحوصات الوراثية(عجام وجماعته ، 1990).

الجزء الوراثي

أُجري هذا الجزء العملي بحسب تعليمات الشركة المصنعة (Comet Assay kit) في ظروف مختبرية مظلمة داخل (Hood) معقم بالإيثانول ومجهز بضوء أصفر ثم أخذ ما يقارب0.125) مايكروليتر (سائل المنوي من القذفة المنوية المجموعة الطازجة و المقيمة ذات الحيوية التي لا تقل عن (75%) و وضعت في أنبوبة أبندروف لغرض تكوين عالق الخلايا وذلك بواسطة غسلها بمحلول الغسل .

الغسل .:(washing)

غُسِلتْ العينات الطازجة بمحلول (PBS(1X)– SDS) (– (1X) phosphate buffer salaine (SDS) الذي يحضر من اذابة1 غم من (SDS) في (100مل) من محلول (PBS(1X) حيث أضِيفَ لكل أنبوبة تحتوي على عينة السائل المنوي (125مايكروليتر)(250 مايكروليتر) من محلول(PBS(1X)– SDS) ثم وُضِعتْ العينات في جهاز الطرد المركزي على قوة (1000) و لمدة 5) دقائق (بعد خروج العينة من جهاز الطرد المركزي يتم إزالةَ الراشح و يبقى الراسب ثم كررت هذه العملية مرتين إضافيتين(Fraser و . Strzezek ، 2004).

الحضن .: (Incubation)

بعد الانتهاء من غسل العينات أضِيفَ لكل عينة (100مايكروليتر) من مادة (PBS(1x)–SDS–pro k) للتخلص من البروتينات ثم حُضِنتْ في الحاضنة على درجة حرارة37 مْ و لمدة ساعة مع المزج . (Fraser and Strzezek , 2004

صب الأكاروس.:(Casting Agarose)

بعد الانتهاء من حضن العينات ننقل العينات الى (Hood) و تستعمل أنابيب أبندروف و تبات معقمة في (Autoclave) ونأخذ من كل عينة 7.5) مايكروليتر (و أضيف لها 75) مايكروليتر (من الأكاروس المذاب ثم أخذ 50)مايكروليتر (من الخليط ويصب عل السلايد الخاص بال (Comet assay kit) و يوضع عليها غطاء السلايد (Cover slip)(Morris و جماعته2002).

تبريد العينات .: (Cooling samples)

بعد صب العينات المضاف لها الأكاروس المذاب على السلايدات وضِعَتْ السلايدات في الثلاجة لمدة (10دقائق) و بعد انتهاء هذه المدة تستخرج السلايدات من الثلاجة ويزال عنها الغطاء ثم أضيف لكل سلايد (50مايكروليتر) من الأكاروس المذاب وغطِّيَ السلايد بغطائه ووضِعَ أيضا في الثلاجة لمدة (10دقائق)ثم بعد ذلك تنقل السلايدات إلى جارة ذات حامل السلايدات تحتوي هذه الجارة على محلول (Lysis solution) إذ وضعت السلايدات في حامل السلايدات و تُرِكتْ في هذا المحلول لمدة يوم ((Fraser و2004 , Strzezek).

الترحيل الكهربائي.:(Electrophoresis)

في اليوم الثاني ترفع السلايدات من محلول (Lysis solution) و تغسل السلايدات بماء مقطر مرتين ثم توضع في جارة أخرى ذات حامل سلايدات تحتوي على محلول (1x) TBE وذلك بوضع السلايدات في حامل السلايدات و تترك لمدة 5) دقائق (ثم ترفع و توضع في طبق الترحيل الكهربائي على فولتية(70فولت) ولمدة (20 دقيقة) (Morrisو جماعته 2002).

التصبيغ.: (Dyeing)

بعد الإنتهاء من الترحيل الكهربائي تغسل السلايدات بماء مقطر مرتين ثم توضع في جارة أخرى ذات حامل سلايدات تحتوي على الإيثانول % 70 لمدة (5دقائق) ثم تغسل أيضا بماء مقطر مرتين و تترك لِتجُفْ ثم وضعت في إناء لغرض تصبيغها بصبغة الفلورسنت (Fluo*plus*) (300مايكروليتر) لمدة (5دقائق) ثم بعدها أيضا غُسِلتْ السلايدات بماء مقطر مرتين و وضع على كل سلايد غطاء سلايد (Cover slip) ثم بعدها حفظت لحين أخذ الصور وإستخراج النتائج بإستخدام جهاز الفلورسنت (Morrisو جماعته 2002).

التحليل الإحصائي.:(Statistical Analysis)

تم تحليل النتائج بحسب تصميم التام التعشية (Completely Randomize Design) و أعتمد أختبار أقل فرق معنوي على مستوى معنوية ($p \leq 0.05$) (الراوي**2000** ,) .

النتائج و المناقشة

تقييم السائل المنوي (Semen Assessment)

تشير النتائج المبينة في جدول (1) الى عدد القذفات المجموعة من الكباش العواسية والتقييم بالعين المجردة (الحجم واللون) كذلك التقييم المجهري(التركيز , الحركة ,الحيوية ونسبة التشوهات في(الرأس, القطعة الوسطية , الذيل)) وعشرة من هذه القذفات التي لا تقل حيويتها عن (75%) إستخدمت في الجزء الوراثي.

جدول (1) يوضح عدد القذفات والتقييم بالعين المجردة والتقييم المجهري للعينات المجموعة من الكباش العواسية

التسلسل	التقييم بالعين المجردة		التقييم المجهري				
	الحجم	اللون	التركيز مليون/سم^3	الحركة		الحيوية%	نسبة التشوهات الرأس , القطعة الوسطية ,الذيل%
				الجماعية %	الفردية %		
1	0.5مل	رصاصي	5	10	1	14	86
2	2.5مل	مائي محمر	1.7	25	10	15	85
3	3.2مل	مائي	2.2	45	30	50	40
4	3مل	مائي	3.5	79	70	75	25
5	2	حليبي	4	35	25	33	67
6	2	حليبي	3	85	80	80	20
7	1.5	قشدي	5	90	85	88	12
8	1	مائي مصفر	4	40	35	32	78

9	1.8	مائي مصفر	2	20	18	18	82
10	2.2	حليبي محمر	3.5	14	10	12	88
التسلسل	التقييم بالعين المجردة		التقييم المجهري				
	الحجم	اللون	التركيز مليون/سم^3	الحركة		الحيوية%	نسبة التشوهات الرأس , القطعة الوسطية , الذيل%
				الجماعية%	الفردية%		
11	1.5	حليبي	3	50	55	50	50
12	2.4	قشدي	2	60	65	60	40
13	2.6	مائي	3	70	75	72	28
14	1.9	حليبي	4	77	75	75	25
15	2	مائي شفاف	1.8	50	45	50	48
16	3	قشدي	5	90	85	90	10
17	1.9	مائي مصفر	3	60	55	63	37
18	2.7	حليبي	3	67	60	65	35
19	1.5	مائي	2	58	52	54	46
20	3	قشدي	4	80	75	77	33
21	2	حليبي	3	85	80	82	28
22	1.5	مائي	2	35	25	30	70
23	2	مائي شفاف	2.5	48	37	39	61
24	2.5	حليبي	3	77	79	76	34
25	3	مائي	2	50	45	40	60
26	2.8	مائي مصفر	3	68	62	65	35
27	3	قشدي	5	90	80	85	15
28	1.7	مائي	3	72	66	70	30
29	2	حليبي	4	85	82	80	20
30	3	مائي	2	45	30	40	60

يلاحظ من جدول (1) انخفاض في حجم السائل المنوي و التركيز و الحيوية حيث تعتمد حجم القذفة المنوية على تكرار القذف و حجم الحيوان , (Hafez, 2000) كما ذكر السعدي (1982) الى أن حجم القذفة المنوية تعتمد على نوع الحيوان و نسله و نسبة التهيج الجنسي أضافة الى أن تأثير المناخ و الفصل و عدد القذفات اليومية والأسبوعية . وأشار الصعب و هوبي (2013) الى أن الخلايا النطفية للأغنام العواسية تكون أكثر حساسية للضوء و الحرارة.

و بما أن هناك علاقة بين رداءة نوعية السائل المنوي و بين المستويات العالية من تضرر الـ DNA (Sunو جماعته1997 ,) ,و كذلك أكد (Irvine وجماعته2000) إرتباط سلامة DNA الخلايا النطفية في الأنسان بنوعية

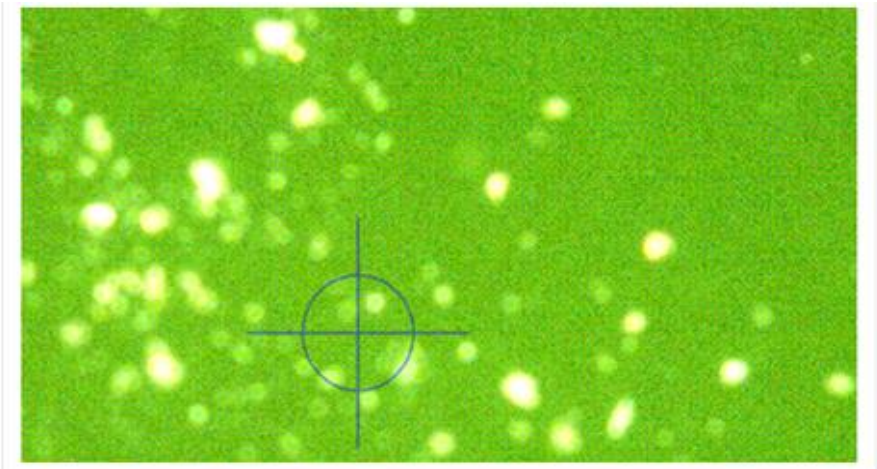
السائل المنوي . ذكر أن الأغنام العواسية أكثر استجابة لتضرر DNA الخلايا النطفية حيث أهملت الكثير من قذفات السائل المنوي لرداءة نوعيتها (Alcayو جماعته2014) .

تقييم الخلايا النطفية جزيئيا من حيث مستوى تضرر DNA بإستخدام اختبار المذنب المتعادل (Natural Comet Assay)

توضح نتائج الدراسة في الشكل (2) إن هناك فروقات معنوية في معدل تضررDNA الخلايا النطفية لعينات السائل المنوي الطازجة على مستوى معنوية ($p \leq 0.05$) من خلال القياسات المعتمدة(معدل طول ذيل المذنب (DNA in Tail)الذي سجل مستوى من DNA المتضرر بنسبة (0.46 ± 9.45) مقارنة بمعدل النسبة المئوية لـ DNAفي ذيل المذنب (DNA% in Tail) الذي سجل مستوى من DNA المتضرر بنسبة (6.05 ±0.28) بينما سجلت القياسات المعتمدة على معدل تعقب لحظة الذيل (DNA Moment) نسبة من DNA المتضرر بنسبة (0.52± 0.62)

جدول (2) قياسات DNA المتضرر للخلايا النطفية في العينات الطازجة بإستخدام إختبار المذنب المتعادل (Natural Comet Assay) في الكباش العواسية.

نوع العينة	عدد الخلايا النطفية	معدل طول ذيل المذنب ±(%)الخطأ القياسي	معدل النسبة المئوية لـ DNA في ذيل المذنب ± الخطأ القياسي	معدل DNA Moment ± الخطأ القياسي
(fresh)	995	9.45 ± 0.4	0.28± 6.0	0.52± 0.62
قيمة أقل فرق معنوي$LSD_{(0.05)}$		0.73	0.53	0.08



شكل (2) التقييم الجزيئي للخلايا النطفية لعينات السائل المنوي الطازجة بإستخدام إختبار المذنب المتعادل (Natural Comet Assay).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية المعتمدة على قياسات معدل طول ذيل المذنب ± 9.45 (Tail length) ومعدل النسبة المئوية DNAفي الذيل (DNA% in tail) المقصود بها (كمية الـ DNA المهاجرة من رأس المذنب الى ذيل المذنب (6.05 ±0.28) و معدل تعقب لحظة الذيل (0.62 ±0.52) (DNA Moment)مستوى متفاوت من DNA المتضرر في الخلايا النطفية لعينات السائل المنوي الطازجة حيث كلما إزدادت قراءات هذه القياسات كلما أزداد معدل تضرر DNA في الخلايا النطفية لعينات السائل المنوي في كباش الأغنام العواسية بنسبة أكبر .

إن المستوى المرتفع لمعدلات تضرر DNA الخلايا النطفية في القذفات الطازجة قد يعود ذلك الى أن الكباش عادة ما يجمع منها السائل المنوي بواسطة المهبل الأصطناعي ونتيجة لذلك قد تخترق البكتريا نوعية السائل المنوي مما تسبب في تدهور نوعيته (Yanizو جماعته2010) حيث ترتبط الزيادة في تجزؤ DNA النطفة مباشرة مع وجود البكتريا (Irvineو جماعته ; Gallegos2000 ,و جماعته2008) .

و ربما يرتبط بالمستويات الطبيعية لأنواعِ الأوكسجينِ التفاعليةِ (ROS) (reactive oxygen species) التي تعد ضرورية لوظائف النطفة الطبيعية و تزداد نسبة (ROS) نتيجة لوجود الخلايا النطفية الشاذة و المتضررة لكن المستويات العالية من (ROS) تكون سببا في حدوث جهد التأكسد (OS) (oxidative stress) الذي بالنهاية يقلل من حركة النطفة و حيويتها و قابليتها الأخصابية و يزيد من نسبة تجزؤ DNA فيها(Agarwalو جماعته Mostafa ;2008, 2006 ,و جماعته Cocuzza ; 2009 ,و جماعته2008 ,) .و هذا يتفق مع ما توصل اليه (2008 (Lopez-Fernandezعند دراسته لتجزؤ DNA الخلايا النطفية في عينات السائل المنوي الطازجة في الخنزير وكذلك Gosalvez و جماعته (2011) عندما درس على عينات السائل المنوي الطازجة في الثور , و يمكن تفسير ذلك أيضا الى أن معدل سرعة تضرر DNA الخلايا النطفية عندما تكون محفوظة بدرجة37) مْ (أثناء نقلها تكون أسرع بحوالي خمس مرات مقارنة بتلك المحفوظة بالتبريد و هذا ما توصل إليه الباحث Lopez- Fernandez و جماعته (2008) عند دراسته لديناميكيات تجزؤ DNAفي الخلايا النطفية للكباش بإختلاف درجات الحرارة التي يتم فيها حفظ السائل المنوي .

يستنتج من هذه الدراسة إن تقييم السائل المنوي مجهريا يعطي فكرة أولية عن نوعية الخلايا النطفية لعينات السائل المنوي في الكباش العواسية و لكنه لا يعطي تقييم دقيق عن مستوى التضرر الحاصل في DNA تلك الخلايا لذلك لا بد من إجراء تقييم أكثر دقة على المستوى الجزيئي .

المصادر العربية Arabic References

الراوي , خاشع محمود .(2000 . المدخل الى الإحصاء , الطبعة الأولى . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي – جامعة الموصل .

السعدي , حسين عبد الكريم السعدي . (1982) .الخصوبة والتلقيح الأصطناعي .كلية الطب البيطري /جامعة الموصل –العراق .

الصعب، حازم كسار جاسر ;عبد الكريم عبد الرضا هوبي .(2013) . تأثير إستخدام التريهالوزTrehaloseفي تجميد السائل المنوي للكباش العواسية .مجلة الأنبار للعلوم البيطرية ,المجلد ,6 العدد.(20-14)1 .

عجام , إسماعيل كاظم; حسين عبد الكريم السعدي ; مرتضى كمال الحكيم .(1990) . فسلجة التناسل و التلقيح الأصطناعي وزارة التعليم العالي و البحث العلمي – جامعة بغداد.

المصادر الأجنبية

Agarwal, A.; Makker, K. and Sharma, R.(2008). Clinical relevance of oxidative in male factor infertility. *Am. J. Reprod Immunol* , 59: 2–11.

Agarwal, A.; Sharma, R.K.; Nallella, K.P.; Thomas, A.J.; Alvarez, J.G. and Sikka, S.C.(2006): Reactive oxygen species as an independent marker of male of factor infertility. *Fertil Steril*, 86:878–885.

ALcay,S.; Toker ,B.; Ustuner, B.; Nur, Z.; Sagirkaya ,H. and Soylu, M.(2014). Investigation of Relationships between DNA Integrity and fresh Semen Parameters in Rams. *Journal* , 20: 793-798.

Cocuzza , M.; Athayde, K.S.; Agarwal, A.; Sharma ,R.;Pagani , R.; and Lucon, A.M.(2008): Age related increase of reactive oxygen species in neat semen in healthy fertile men. *Urology* .71: 4-490.

Fraser , L and Strzezek , J. (2004). The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5˚C and 16˚C. *Folia. Histochemicaet. Cytobiologic* .,1: 49-55.

Gallegos, G.; Ramos, B.; Santiso, R.; Goyanes, V. and Gosalvez, J (2008). Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by Chlamydia trachomatis and Mycoplasma . *Fertil. Steril*., 90: 328-334.

Gosalvez, J.; Lopez-Fernandez, C.; Fernandez, J.L.; Gouraud, A. and Holt, W.V.(2011): Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Mol. Reprod. Dev*. 78: 951–961.

Gonzalez-Marín , C ; Gosálvez , J. and Roy , R .(2012) :Types, Causes, Detection and Repair of DNA Fragmentation in Animal and Human Sperm Cells.*International Journal of Molecular Sciences* . 13, 1-2 .

Hafez, E.S.E and Hafez ,B.(2000). Reproduction in Farm animal. *Baltimore, MD: Lippincott Williams and Wilkins*. 7th ed

Irvine, D.S.; Twigg, J.P.; Gordon, E.L.; Fulton, N.; Milne, P.;A. and Aitken, R.J. (2000). DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality . *J Androl* ., 21: 33-44.

Langdon , W.C.(2012). A comparative study on equine sperm chromatin using theSperm Chromatin Structure Assay and the Sperm-Halomax kit. *Thesis M.C.animal science Faculty of Texas University* ., 11: 18- 82.

Lopez- Fernandez, C.B.; Perez-Llano, P.; García-Casado, R.; Sala, A.; Gosalbez, F.; Arroyo, J. L. Fernandez, and Gosálvez, J. (2008). Sperm DNA fragmentation in a random sample of the Spanish boar livestock . *Animal Reprod.*, 103; 87-98.

Mostafa, T.; Anis, T.; Imam, H.;, El-Nashar, A.R.and Osman, I.A. (2009). Seminal reactive oxygen species-antioxidant relationship in fertile males with and without varicocele. *Andrologia* .,41: 9-125.

Morris, I. D.; llott ,S.; Dixon, L. and Brison, D.R.(2002).the spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development . *Human Reproduction* ., 4: 990-998.

Sun, J.K .; Jurisicova , A.; Casper,R.F.(1997). Detection of deoxy- ribonucleic acid fragmentation in human sperm: Correlation with fertilization in vitro. *Biol. Reprod* ., 56:602 – 607.

Y**aniz, J.L.; Marco-Aguado, M.A.; Mateos, J.A. and Santolaria , P. (2010).** Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15 degrees C . *Animal Reproduction Science*.,1: 142-149.