دراسة تأثير مخففات السائل المنوي على سلامة المادة الوراثية للكباش العواسية

هيام عبد العظيم الحسيني تحرير الثويني إسماعيل كاظم

جامعة القاسم الخضراء/ كلية الزراعة

الخلاصة :.

أُجريت هذه الدراسة في كلية الزراعة / جامعة القاسم الخضراء للفترة من 2014/9/1 ولغاية 2015/5/28 على الكباش العواسية المدربة على جمع السائل المنوي وهدفت هذه الدراسة الى دراسة تأثير الاوساط الغذائية المضافة الى عينات السائل المنوي على سلامة DNA الخلايا النطفية في الكباش العواسية ، باستخدام أختبار المذنب . وأستخدم في هذه الدراسة نوعين من المخففات الشائعة الاستخدام في تخفيف السائل المنوي و هما مخفف ترس و مخفف الحليب المضاف لهما صفار البيض و مقارنة العينات المخففة مع العينات الطازجة من خلال تقييم سلامة DNA الخلايا النطفية وقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن هناك تأثير معنوي($p\leq 0.05$) لنوع المخفف على طول ذيل المذنب حيث أظهرت العينات الطازجة مستوى عالٍ من DNA المتضرر(9.45 ±0.46) مقارنة بالعينات المخففة بمخفف ترس(4.68 ±0.18) و يليها مخفف الحليب (6.21±0.20) ، لنوع المخفف تأثير معنوي ($p\leq 0.05$) على النسبة المئوية DNA في الذيل و تعقب لحظة الذيل ، أظهرت العينات المخففة بمخفف الحليب مستوى متوسط من ال DNA المتضرر (6.05 ±0.28) و (0.62±0.52) على التوالي. يستنتج من هذه الدراسة ان مخفف ترس بتركيز (4.2%) كان الأفضل من حيث سلامة المادة الوراثية مقارنة بمخفف الحليب و عينات السيطرة .

Study The effect of different dilution to the semen samples on DNA integrity in the sperm of Awassi Rams

Hiam AL-Husseiny Tahreer AL-Thuwaini Ismael Kadhum

AL-QASIM GREEN University / College of Agriculture

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 and this study aimed to determine the impact of additive Nutrient extender added to the semen samples on DNA Integrity of spermatocyte in Al-awassi rams using "Comet Assay". Two types of common extender were in this study used for semen dilution and they are(Tris dilute and milk dilute added to them egg yolk) and compare , diluted samples with fresh samples through the assessment of DNA integrity of spermatocyte. The results of current study showed the following : Significant effect ($P \leq 0.05$)of diluted type on the tail length of a comet, where fresh samples showed high level of DNA damaged (% 9.45 ± 0.46) compared to the diluted samples in Tris diluted (% 4.68 ± 0.18) and followed by the milk diluted (% 6.21 ± 0.20) . Type of extender showed significant effect (P ± 0.05) on the percentage of DNA in the tail and the tail moment where the milk diluted samples showed medium level of the damaged DNA (% 6.05 ±0.28) and (%0.62 ± 0.52) respectively. This study concluded that Tris dilute concentration(4.2%) was the best type in the DNA integrity compared to Milk dilute and control samples.

* البحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الاول

المقدمة :.

تعد الكباش أحد انواع الحيوانات التي أظهرت سرعة في تحطم DNA الخلايا النطفية مقارنة بالحيوانات الأخرى تحت ظروف تجريبية مماثلة (Lopez -Fernandez و جماعته .، 2008). وفي دراسة أجراها Lopez-Fernandez (2008) لمعرفة التغيرات الديناميكية للمعدلات الاساسية لتجزؤ DNA النطفة و حيوية النطف في السائل المنوي المبرد للكبش فأظهرت نتائج الدراسة زيادة كبيرة في تجزؤ DNA النطفة في خلال فترة قصيرة من الزمن (Gonzalez-Marin و جماعته .، 2012). أقترح في الوقت الحاضر تقييم سلامة DNA الخلايا النطفية كعلامة مستقلة للخصوبة في الذكور (Gonzalez-Marín و جماعته .، 2012) ، و تظهر بعض الخلايا النطفية حركة مستمرة وسلامة غشائها البلازمي مع عدم سلامة ال DNA الخاص بها و يقلل من قابليتها الاخصابية لا سيما عند خزنها لفترة طويلة من الزمن (Fraser و جماعته ، 2002) و وجد ان تحطم ال DNA يمكن ان يستحث بشكل تجريبي في الخط الجرثومي للإباء (Gonzalez-Marin و جماعته.، 2012) . كما وجد ان انواع الاوكسجين التفاعلية و الحفظ بالتبريد تعزز من تجزئة ال DNA ولهذا السبب يفضل استخدام مضادات الاكسدة و اضافتها الى مخففات السائل المنوي لتحسين حيوية النطف عند حفظها بالتبريد في أنواع من الثدييات مثل الكباش (Maxwell and Stojano ، 1996). يعد اختبار المذنب (Comet assay) و يسمى ايضا (اختبار الترحيل الكهربائي لهلام الخلية المفردة) (single – cell gel electrophoresis) من أبسط الاختبارات نسبيا للكشف عن تضرر ال DNA في الخلايا المفردة ، و يتضمن هذا الاختبار خطوة الترحيل الكهربائي للتمييز بين ال DNA السليم و التحطم الحاصل في أشرطة ال DNA المفردة أو المزدوجة (González-Marin و جماعته ، 2012).

استعملت المخففات و هي أوساط تخفيف ذات القدرة الوقائية لغرض توفير الحماية للنطف و سلامة بقائها لمدة أطول (Hafez ، 1987 ; Royer و جماعته، 1996) ، و على الرغم من أن العديد من الباحثين وضعوا مخففات و بروتوكولات مختلفة لغرض تجميد السائل المنوي في الكباش إلا أن نتائج الخصوبة ليست مماثلة مقارنة لتلك المتحصل عليها في السائل المنوي الطازج (Coyan و جماعته، 1992 ; Fiser and Fairfull ، 1984).

لقلة الدراسات المتوفرة حول معرفة تأثير الأوساط الغذائية المضافة إلى عينات السائل المنوي ومدى تأثيرها على سلامة المادة الوراثية في كباش الأغنام العواسية وانسجاما مع التطورات الحاصلة في مجال الوراثة الجزيئية ، لهذا جاء الهدف من هذه الدراسة لمعرفة تأثير الأوساط الغذائية المضافة إلى عينات السائل المنوي على سلامة المادة الوراثية للخلايا النطفية في الأغنام العواسية .

المواد و طرائق العمل :.

أجريت هذه التجربة في مختبر التقانات الأحيائية في قسم الثروة الحيوانية / كلية الزراعة / جامعة القاسم الخضراء ، للفترة من 1/ 9 / 2014 و لغاية 28 / 5 / 2015 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

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 (Artificial Vagaina) (AV) 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 حرارة 37مْ .

بعد 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 (1.5-3 مل) .

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

التقييم المجهري Microscope Assessment :.

الحركة الجماعية و الحركة الفردية Sperm Movement :.

أخذت قطرة من كل قذفة منوية ووضِعَتْ على شريحة زجاجية دافئة موضوعة مسبقا في حاضنة كهربائية درجة حرارتها 37مْ 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).

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 (0.1 سم3) من عينة السائل المنوي (20 سم3) من محلول الملح الفسيولوجي و يخلط جيدا حتى يتجانس و بهذا تكون نسبة تخفيف السائل المنوي (1 الى 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 (16 مربع صغير) فهذا يعني تم عد النطف الموجودة ضمن (80 مربع 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 التخفيف /1

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 (السعدي ، 1982) .

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 و جماعته ، 1990) .

التخفيف :.

أُستخدمتْ في هذه التجربة نوعين من مخففات السائل المنوي الشائعة الاستخدام أحدهما مخفف ترس والاخر مخفف الحليب الخالي من الدسم .

مخفف ترس(Tris extender)(4.2%) :.

حُضِرَ مخفف (ترس – حامض الستريك – صفار البيض) من 3.36غم من مسحوق (ترس- هيدروكسي مثيل- أمينو ميثان) و 1.99غم من حامض الستريك و 0.5 غم من الكلوكوز و 16 غم من مسحوق صفار البيض ثم ذوبت جميع هذه المواد في 80 مل من الماء المقطر (Fraser and Strzezek ، 2004).

مخفف الحليب (Milk extender) (10%) :.

حُضِرَ مخفف الحليب من 10غم من مسحوق الحليب الخالي من الدسم و 0.9غم من الكلوكوز ثم ذوبت في 100 مل من الماء المقطر و سخن المحلول على درجة حرارة 95مْ لمدة 10 دقائق بعدها أُضيف الى المحلول 10غم من مسحوق صفار البيض (Fraser and Strzezek ، 2004) .

الجزء الوراثي :.

أُجريت هذا الجزء العملي بحسب تعليمات الشركة المصنعة ل (Comet Assay kit) (الاختبار المذنب) في ظروف مختبرية مظلمة داخل (Hood) معقم بالإيثانول و مجهز بضوء أصفر ثم وزعت القذفة المنوية المجموعة و المقيمة ذات الحيوية التي لا تقل عن (75%) على ثلاث أنابيب أبندروف كل أنبوبة تحتوي على (0.125 مايكروليتر) من السائل المنوي ، أثنان من هذه الأبندروفات أضيف لها مخففات أحدها أضيف لها مخفف ترس والأخرى أضيف لها مخفف الحليب أما الأبندروفة الثالثة فلم يضاف لها شيء أي بقيت عينة السائل المنوي طازجة ، ثم بعد ذلك أخذت هذه العينة الطازجة لغرض تكوين عالق الخلايا وذلك بواسطة غسلها بمحلول الغسل أما العينات المخففة فحفظت بالتبريد على درجة حرارة 4مْ لليوم التالي.

الغسل (washing):.

غُسِلتْ العينات بمحلول (phosphate SDS) (buffer salaine (1X) - (PBS(1X)- SDS) الذي يحضر من اذابة 1غم من (SDS) في (100مل) من محلول (PBS(1X) حيث أضِيفَ لكل أنبوبة تحتوي على عينة السائل المنوي (125 مايكروليتر) (250 مايكروليتر) من محلول ال(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 and Strzezek ، 2004).

الحضن :.

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 حرارة 37مْ و لمدة ساعة مع المزج Fraser and Strzezek ، 2004) .

صب الأكاروس :.

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 جماعته ، 2002)

تبريد العينات :.

بعد صب العينات المضاف لها الأكاروس المذاب على السلايدات وضِعَتْ السلايدات في الثلاجة لمدة (10 دقائق) و بعد انتهاء هذه المدة تستخرج السلايدات من الثلاجة ويزال عنها الغطاء ثم أضيف لكل سلايد (50 مايكروليتر) من الأكاروس المذاب وغطِّيَ السلايد بغطائه ووضِعَ أيضا في الثلاجة لمدة (10 دقائق) ثم بعد ذلك تنقل السلايدات إلى جارة ذات حامل السلايدات تحتوي هذه الجارة على محلول ال (Lysis solution) إذ وضعت السلايدات في حامل السلايدات و تُرِكتْ في هذا المحلول لمدة يوم) (Fraser and Strzezek ، 2004).

الترحيل الكهربائي :.

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

التصبيغ :.

بعد الإنتهاء من الترحيل الكهربائي تغسل السلايدات بماء مقطر مرتين ثم توضع في جارة أخرى ذات حامل سلايدات تحتوي على الإيثانول 70 % لمدة (5 دقائق) ثم تغسل أيضا بماء مقطر مرتين و تترك لِتجُفْ ثم وضعت في إناء لغرض تصبيغها بصبغة الفلورسنت (Fluo*plus*) (300 مايكروليتر) لمدة (5 دقائق) 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 (Morris و جماعته ، 2002).

4- 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 :.

تأثير الأوساط الغذائية المضافة في طول ذيل المذنب (Tail length) في الخلايا النطفية للكباش العواسية .

توضح نتائج الدراسة في الجدول (3) ان هناك فرق معنوي في معدل طول ذيل المذنب (Tail-length) على مستوى معنوية ($p \leq 0.05$) بإختلاف نوع المخفف. حيث كان معدل طول الذيل بإستخدام مخفف الترس (Tris) (4.68±0.18 %) خلال فترة (24 ساعة) من الخزن بالتبريد على درجة حرارة (4مْ) مقارنة بالسيطرة (9.45±0.46%) . بينما كان معدل طول المذنب (6.21±0.20%) بإستخدام مخفف الحليب في خلال فترة (24 ساعة) بدرجة حرارة 4مْ .

كلما أزداد معدل طول ذيل المذنب (Tail length) كلما دل ذلك على حصول تضرر في DNA الخلايا النطفية لعينات السائل المنوي في الأغنام العواسية بنسبة أكبر مقارنة بتلك التي يكون فيها معدل طول ذيل المذنب (Tail length) قصير الذي يدل على أن الخلية النطفية غير متضررة. و في الأغنام فأن أفضل حركة للنطف و معدلات سلامة الغشاء تكون في مخفف الترس مقارنة بمخفف الحليب (Lopez و جماعته، 1999) . و أشار Jimenez-Rabadan و جماعته (2012) الى أن عينات النطف المحفوظة في المخففات أعطت خلايا نطفية ذات نوعية جيدة .

ان 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 (Yaniz و جماعته ، 2010) حيث ترتبط الزيادة في تجزؤ DNA النطفة مباشرة مع وجود البكتريا (Irvine و جماعته، 2000; Gallegos و جماعته، 2008) .

و ربما يرتبط بالمستويات الطبيعية لأنواع الأوكسجينِ التفاعليةِ (reactive oxygen species) (ROS) التي تعد ضرورية لوظائف النطفة الطبيعية و تزداد نسبة ال(ROS) نتيجة لوجود الخلايا النطفية الشاذة و المتضررة لكن المستويات العالية من (ROS) تكون سببا في حدوث جهد التأكسد (oxidative stress) (OS) الذي بالنهاية يقلل من حركة النطفة و حيويتها و قابليتها الأخصابية و يزيد من نسبة تجزؤ ال DNA فيها (Agarwal و جماعته، 2006 ،2008; Mostafa و جماعته، 2009 ; Cocuzza و جماعته، 2008). و هذا يتفق مع ما توصل اليهLopez-Fernandez (2008) عند 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 بدرجة (37مْ) 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 ال DNA في الخلايا النطفية للكباش بإختلاف درجات الحرارة التي يتم فيها حفظ السائل المنوي .

تأثير المخففات المضافة في النسبة المئوية ل DNA في ذيل المذنب (DNA% in Tail) في الخلايا النطفية للكباش العواسية .

تشير نتائج الدراسة الى وجود فرق معنوي ($p \leq 0.05$) في معدل النسبة المئوية لDNA في ذيل المذنب باختلاف نوع المخفف حيث كانت بإستخدام مخفف ترس هي (5.52 ±0.19) في حين بلغت النسبة بإستخدام مخفف الحليب (6.43±0.20) مقارنة بالسيطرة (6.05 ±0.28) (جدول 4) .

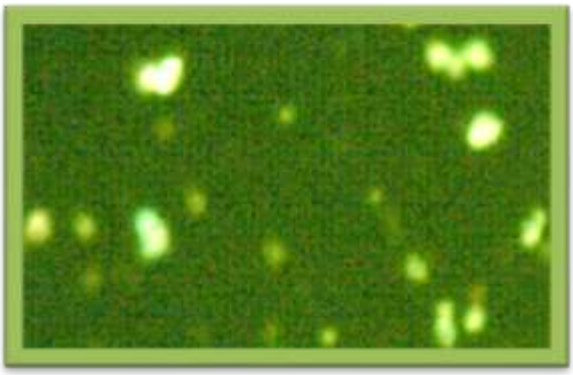
جدول (3) تأثير نوع المخفف في طول ذيل المذنب في DNA الخلايا النطفية لعينات السائل المنوي لسلالة الأغنام العواسية .

نوع المخفف	عدد الخلايا النطفية	معدل النسبة المئوية لطول ذيل المذنب (%)± الخطأ القياسي
السيطرة (fresh)	995	0.46±9.45
Tris	995	0.18±4.68
Milk	998	0.20 ±6.21
قيمة أقل فرق معنوي $LSD_{(0.05)}$	0.73	

جدول(4) يبين تأثير المخفف على النسبة المئوية لل DNA في ذيل المذنب في الخلايا النطفية لعينات السائل المنوي في الكباش العواسية .

نوع المخفف	عدد الخلايا النطفية	معدل النسبة المئوية لل DNA في ذيل المذنب ± الخطأ القياسي
السيطرة (fresh)	995	0.28± 6.05
Tris	995	0.19± 5.52
Milk	998	0.20±6.43
قيمة أقل فرق معنوي $LSD_{(0.05)}$	0.53	

أظهرت نتائج الدراسة الحالية المعتمدة على قياسات النسبة المئوية ل DNA في الذيل (DNA% in tail) المقصود بها (كمية ال DNA المهاجرة من رأس المذنب الى ذيل المذنب) و التي تزداد مع المستوى العالي من ال DNA المتضرر في الخلايا النطفية لعينات السائل المنوي الطازجة مقارنة بالخلايا النطفية لعينات السائل المنوي المخففة في الأغنام العواسية، حيث كان معدل نسبة% DNA في الذيل(6.05±0.28) للعينات الطازجة و هذا يتفق مع ما ذكره Morris و جماعته (2002) و وجد أن نسبة ال DNA% في الذيل للخلايا النطفية في عينات السائل المنوي الطازجة في الأنسان تكون 35% بينما أظهر مخفف الحليب مستوى أقل من الDNA المتضرر(6.43±0.20) مقارنة بعينة السيطرة (6.05 ±0.28) و أقل منهما مخفف ترس(5.52 ±0.19) .



شكل (1) DNA الخلايا النطفية في العينة المخففة بمخفف الترس

ويمكن أن نفسر ذلك الى وجود الكازين في مخفف الحليب الذي يعمل كمادة مضادة للتأكسد و بالتالي يقلل من تضرر الDNA (Akhter و جماعته، 2011) و كذلك أحتوائه على بروتينات الحليب و سكر الحليب الذي يحافظ على ديمومة بقاء النطف حية (الخشاب، 2012) أن تضرر DNA الخلايا النطفية يمكن أن تكون لها صلة بالتغيرات الحاصلة في التعبئة الطبيعية لكروماتين الخلايا النطفية (Karabinus and Evenson ، 1991) . أن تعبئة الكروماتين تتغير أثناء التخزين كلما طالت مدة الخزن في الثيران ، و يمكن أن يكون الضرر التأكسدي للمستويات العالية من (ROS) والناتج من الخلايا النطفية المسنة و الشاذة هو الذي يسبب تضرر DNA الخلايا النطفية (Fraser and Strzezek ، 2004).

المصادر

الخشاب ، عبد الناصر ذنون محمود الخشاب .(2012). تأثير نوع المخفف و فترات الخزن على بعض صفات السائل المنوي في الكباش العواسية . مجلة الرافدين، المجلد40 الملحق2 (193-201).

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

الراوي ، خاشع محمود . (2000). المدخل الى الإحصاء ، الطبعة الأولى . وزارة التعليم العالي و البحث العلمي – جامعة الموصل.

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

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.

Akhter, S.; Rakha, B. A.; Ansari, M. S.; Andrabi , S. M. H. and Ullah, N.(2011). Storage of Nili-Ravi buffalo (Bubalus bubalis) semen in skim milk extender supplemented with ascorbic acid and α-tocopherol. *Pak. J. Zool* .43: 273-277.

Coyan , K.; Aksoy,M.; Tekeli , T.; Ayar , A.; and Ataman, M.B.(1992). Die intrauterine Besamung von Schafen unter Anwendung des tiefgefrorenen Spermas mit Hilfe der Laparoskopie . *Hayvancilik Arastırma Dergisi* . 2: 15-17 **.**

Fiser , P. and Fairfull ,R.W.(1984). The effect of glycerol concentration and cooling on velocity cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology* ., 21: 542-551.

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.

Fraser, L.; Lecewicz , M.; Krasicki, R. and Strzezek, J. (2002). Effect of extender composition and storage temperatures on motility of preserved semen. *J. Anim Feed Sci*., 11: 66-661.

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.

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.

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 .

semen diluted and stored in three different extenders. *Acta Veterinaria Scandinavica* .40 :1-9.

Maxwell ,WMC.and Stojanov,T.(1996). Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants . *Reprod Fertile Dev* . 1013: 8-20.

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.

Royere,D.; Barthelemy, C .; Hamama , S.; and Lansac , S. (1996). Cryopreservation of spermatozoa **.** *Hum Reprod* **.**,2 : 553-559.

Yaniz, 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.

Hafez , E.S.E. (1987). Production in farm animals . *Lea &* Ferbiger Philadelphia .5th.

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.

Jimenez-Rabadan, P.; Ramon, M.; Garcia-Alvarez, O.; Maroto- Morales, A.; del Olmo, E.; Perez-Guzman, M.D.; Bisbal, A.; Fernandez - Santos, M.R.; Garde, J.J. and Soler, A.J.(2012). Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation) , extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtiberica buck ejaculates. *Anim Reprod*. Sci. 132: 88–95 .

Karabinus, D.S.and Evenson, D.P. (1991): Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm . *J Dairy Sci* . 74: 3836-3848.

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.

Lopez, A.; Soderquist, L. and Rodriguez-Martinez,H.(1999). Sperm viability in ram