تأثير إضافة الغلوتامين في السائل المنوي المجمد داخل الموسم التناسلي عند كباش العواس السورية

*د. محمد زهير الأحمد

(الإيداع: 30 تشرين الأول 2017، القبول: 5 كانون الأول 2017)

الملخص:

يهدف هذا البحث إلى دراسة تأثير إضافة الحمض الأميني الغلوتامين في وقاية السائل المنوي المجمد للكباش العواس من صدمة البرد وتحديد أفضل تركيز من الغلوتامين يؤدي إلى تحسين حركية النطاف بهدف الحصول على ممدد واقي من صدمة البرد للسائل المنوي للكباش يعادل أو يفوق جودة الممددات التجارية من خلال إضافة هذا الحمض الأميني.

أجريت الدراسة في مختبر التلقيح الاصطناعي ونقل الأجنة التابع لمحطة بحوث إزرع في المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (أكساد).

استخدمت ستة كباش من أغنام العواس بعمر 3–6 سنوات ومتوسط أوزانها 79 ± 2,8 كغ لجمع السائل المنوي بمعدل مرة واحدة أسبوعياً من كل ذكر ولمدة أربعة أسابيع داخل الموسم التناسلي باستخدام المهبل الاصطناعي.

استخدم التريلاديل ®Triladyl، المضاف له 20 % (v/v) صفار البيض و6,4 % (v/v) غليسيرول، كوسط تجميد مرجعي (شاهد).

أضيف إلى الممدد المحدد سابقاً تراكيز مختلفة من الحمض الأميني الغلوتامين (10 و20 و30 و40 و50 ميلي مول/مل) لدراسة تأثيره على السائل المنوي المجمد عند كباش العواس. حللت بعد ذلك القشات المجمدة باستخدام جهاز تحليل السائل المنوي بمساعدة الحاسب (CASA).

وتم قياس الحركية، والحركية التقدمية، ومسافة الخط المستقيم (DSL)، ومعدل سرعة المسار (VAP)، السرعة الخَطِّية المنحنية (VCL)، والسرعة الخَطِّية المستقيمة أو التقدمية (VSL)، وخطية المسار (LIN)، والمدى الجانبيِ لضربات الرأس (ALH).

أظهرت النتائج أن إضافة الغلوتامين بتركيز 20 ميلي مول يحسن وبشكل معنوي الحركية والـ (VCL,DSL) بالمقارنة مع التراكيز الأخرى والممدد الشاهد.

الكلمات المفتاحية: السائل المنوي، الغلوتامين، الممدد، الكباش العواس، التلقيح الاصطناعي.

*أستاذ مساعد في قسم الجراحة والولادة، كلية الطب البيطري، جامعة حماة

The Effect of Addition of Glutamine on Frozen Semen during Breeding Season in Syrian Awassi Rams

*Dr. M.Z. Ali Al-Ahmad

(Received: 30 October 2017, Accepted: 5 December2017)

Abstract:

The aim of this research was to study the cryoprotective effect of addition of glutamine for freezing Awassi ram semen and to determine the optimal concentration of glutamine to improve the motility of spermatozoa for define a cryopreservation extender for ram sperm of an equivalent or superior quality to commercial extenders.

This study was carried out at the laboratory of artificial insemination and embryo transfer in Ezra station Belongs to ACSAD.
Six Awassi ram, 3-6 years old with body weight 79 ± 2.8 KG, were used. Semen was collected in breeding season by artificial insemination one/per week for 4 weeks. Glutamine was added in different concentrations to local diluents (Triladel© with egg yolk).
The glutamine was added to 6 splite ejaculates at concentrations of (10, 20, 30, 40, 50 mM) in breeding season.

The quality of frozen-thawed spermatozoa in each extender was analyzed using computer assisted semen analysis (CASA). The evaluated parameters were Mobility, Progressive, Distance Straight Line: (DSL), Velocity Average Path: (VAP), Curvilinear Line Velocity: (VCL), Straight Line Velocity: (VSL), linearity index: (LIN), and amplitude of lateral head displacement: (ALH).
Results showed that the glutamine at a concentration of 20mM significantly improves the motility and (VCL, DSL) compared with other concentration and control extender.

Keywords; semen, glutamine, extender, Awassi ram, Artificial Insemination.

*Assist. Prof. In Department of Surgery and Obstetrics, Faculty of Veterinary Medicine, Hama University

1-المقدمة Introduction:

تمثل تقانة التلقيح الاصطناعي ومايتطلب من حفظ للسائل المنوي خارج جسم الحيوان وتجميده وتخزينه لفترات طويلة مع الحفاظ على القدرة الإخصابية للنطاف من أهم التقانات الحيوية الحديثة والتي تتطلب الكثير من الجهود والإضافات التي ينبغي دراستها بدقة وتحديد دورها.

فقد بين (Amann and Pickett, 1987) إن عملية تجميد وتذويب السائل المنوي هي عملية معقدة تؤدي إلى أشكال مختلفة من الأذيات والتي تتمثل بتشكل بللورات جليدية داخل خلوية وحدوث تجفاف خلوي الأمر الذي يقود إلى زيادة تركيز السائل داخل السيتوبلاسما، ويعود سبب تشكل هذه الأذيات إلى استخدام الواقيات التقليدية ذات التأثير السام مثل الغليسيرول كما أورد (Garner, 1991).

كذلك أثبت كلاً من (Katkov *et al.*, 1998) و (Garner, 1991) أن جميع الواقيات من صدمة البرد لها تأثير سام على النطاف وخصوصاً الغليسيرول، وإن هذه الأذيات تدفعنا للبحث من أجل إيجاد جزيئات خلوية أقل سمية على النطاف المجمدة، ولقد أصبحت دراسة تأثير الأحماض الأمينية على النطاف المجمدة عند الثدييات هدف العديد من الدراسات منذ الـ 20 سنة الماضية.

فقد بين (Koskinen *et al.*, 1989) إن إضافة البيتائين بتركيز 2,5 % يحسن حركية النطاف عند الخيول.
وأكد (Dhami *et al.*, 1994 ; 1995) إن إضافة السيستين بتركيز 0,1% إلى ممدد يحتوي صفار البيض والغليسيرول يحسن وبشكل معنوي جودة وخصوبة النطاف عند الثيران، وعند الجاموس كما أورد (Iqbal and Hunter, 1991).

وكذلك بين (Sanches-Partida *et al.*, 1992) بأن حركية النطاف عند الكباش تتحسن وذلك بمشاركة تراكيز منخفضة من البرولين والبيتائين جلايسين وإضافتها إلى ممدد يحتوي صفار البيض والغليسيرول.

ووجد (Li Y *et al.*, 2003) أنه عند مشاركة الجلايسين والبيتائين والغلوتامين تتحسن حركية النطاف عند قردة المكاك.
ولقد توصلت (Amirat-Briand *et al.*, 2009) إلى أن إضافة الغلوتامين بتراكيز مرتفعة يؤدي إلى إرتفاع الضغط الأسموزي لمحلول التمديد ولكن عند مشاركته مع الدهون منخفضة الكثافة (LDL) يؤدي إلى انخفاض الضغط الأسموزي.
ووجدت (Amirat-Briand *et al.*, 2009) أن إضافة الغلوتامين بتركيز 40 ميلي مول يحسن وبشكل معنوي حركية النطاف عند الثور بينما إضافته بتركيز 120 ميلي مول يؤدي إلى انخفاض الحركية، وتوصلت في نهاية دراستها إلى إن أفضل تركيز يمكن إضافته من الغلوتامين هو 10 ميلي مول بمشاركة الـ (LDL).

بينما توصل (Kruuv and Glofcheski, 1992) إلى إن إضافة الأحماض الأمينية بتراكيز محصورة مابين 10-90 ميلي مول يؤدي إلى حماية النطاف عند الهامستر الصيني أثناء عملية التجميد والإذابة.
وأثبت (Trimeche *et al.*, 1999) أن إضافة الغلوتامين والبرولين بتركيز من 10-80 ميلي مول يحسن وبشكل معنوي حركية النطاف للخيل وأفضل حركية كانت عند إضافة الغلوتامين بتركيز 50 ميلي مول والبرولين بتركيز 30 ميلي مول.

وقد قامت (Khlifaoui *et al.*, 2005) بمقارنة تأثير إضافة الغلوتامين والغليسيرول بتراكيز مختلفة على حركية السائل المنوي المجمد للخيول في ممدد (INRA) والتحقق فيما إذا كان هناك تفاعل إيجابي بين الوسط الممدد والسائل المنوي المجمد للخيل ودراسة حركية اختراق الغلوتامين والغليسيرول للنطاف.

وتوصلت (Khlifaoui *et al.*, 2005) إلى أن حركية النطاف أنخفضت وبشكل معنوي في الممدد الشاهد بالمقارنة مع الوسط الأخر بينما أرتفعت الحركية عند إضافة 50 ميلي مول غلوتامين و2.5 % غليسيرول إلى الممدد الشاهد بالمقارنة بالممددات الأخرى.

وكذلك وجد (Trimeche *et al.*, 1999) إن إضافة الغلوتامين أو البرولين بتركيز 30-80 ميلي مول إلى ممدد INRA82 يحسن وبشكل معنوي حركية النطاف عند الخيل. وبين كذلك (Trimeche *et al.*, 1999) أن إضافة البرولين له تأثير أقل على النطاف من إضافة الغلوتامين ولم يلاحظ أي إختلاف عند إضافة الهيستدين والبيتائين بتركيز 40 أو 80 ميلي مول.

وأكد (Trimeche *et al.*, 1999) أن إضافة الهيستدين والبيتائين والبرولين بتركيز 120 ميلي مول لم يحسن حركية النطاف بينما إضافة هذه الأحماض بتركيز 160 ميلي مول أدى إلى انخفاض حركية النطاف وبشكل معنوي.

لقد أثبتت الدراسات السابقة أن التراكيز المرتفعة من الأحماض الأمينية لها تأثير سام على النطاف عند الكباش كما بين (Sanches-Partida *et al.*, 1992) وكذلك عند حمار البواتو بحسب (Trimeche *et al.*, 1996[a]) وعند الإنسان كما وضح (Renard *et al.*, 1996).

وقد قام (Kruuv and Glofcheski, 1992) بشرح التأثير السام للتراكيز المرتفعة من الغلوتامين على الضغط الأسموزي للممدد فهو يعمل على معادلة الوسط وجعلة أكثر حساسية لفرط التوتر وهذا يتفق مع ما توصل إليه (Trimeche *et al.*, 1996[b]) من أن التأثير السام للتراكيز المرتفعة من الغلوتامين على السائل المنوي لحمار البواتو بأنها تؤثر على الضغط الأسموزي للممدد، ولقد بين (Ali Al-Ahmad *et al.*, 2008) إن إضافة الغلوتامين أدى إلى إرتفاع الضغط الأسموزي للممدد والذي يتناسب طرداً مع تركيز الغلوتامين ، ووجد أيضاً أن مشارك الدهون منخفضة الكثافة مع الغلوتامين يؤدي إلى انخفاض الضغط الأسموزي للممدد، وتوصل كذلك (Ali Al-Ahmad *et al.*, 2008) إلى أن إضافة الغلوتامين بتركيز من 20-40 ميلي مول يحسن وبشكل معنوي حركية النطاف للتيوس، بينما إضافته بتركيز من 80-120م يلي مول يؤدي إلى انخفاض حركية النطاف.
واستطاع (Ali Al-Ahmad *et al.*, 2008) أن يحدد إنه أفضل تركيز يجب إضافته من الغلوتامين إلى السائل المنوي للتيوس هو 25 ميلي مول.

تهدف هذه الدراسة إلى دراسة تأثير الحمض الأميني الغلوتامين في وقاية النطاف في السائل المنوي المجمد للكباش العواس من صدمة البرد من خلال دراسة تأثير إضافة تراكيز مختلفة من الغلوتامين (10 و20 و30 و40 و50 ميلي مول/مل محلول تمديد) إلى الممدد التجاري التريلاديل من أجل تحديد أفضل تركيز من الغلوتامين ومدى تأثيره في مؤشرات حركية النطاف المختلفة (MOT، PROG، VAP، VSL، VCL، DAP، DCL، DSL،ALH ، LIN) عند الكباش داخل الموسم التناسلي.

2-المواد وطرائق العمل Material and Methods:

1.2. أوساط الحفظ بالتجميد:

استخدم في هذه الدراسة ممدد التريلاديل Triladyl® (Minitüb, Tiefenbach, Allemagne)، المضاف له 20 % (v/v) صفار البيض و6,4 % (v/v) غليسيرول، كوسط تجميد مرجعي (شاهد).

التريلاديل هو عبارة عن محلول ملحي يحتوي على 2,42 غ من التريس-(هيدروكسي ميثيل) أمينو ميتان، 1,00 غ من الفركتوز، 1,48 غ من حامض الستريك، 25 ملغ من الجنتامايسين و50000 وحدة دولية من البنسلين -الستربتومايسين لكل 100 مل ماء مقطر مرتين.

في هذه الدراسة أضيف الغلوتامين بتراكيز مختلفة إلى الممدد الشاهد وهي (10 و20 و30 و40 و50 ميلي مول/مل).
ضُبط الـ pH في الممدّدات على 6,8. وقيس الضغط الأسموزي قبل الاستعمال عبر مقياس التناضح (مقياس تناضح هيرمان رويبلنج نوع DR 13/13 آلي -ألمانيا) وذُكر (المتوسط ± الانحراف المعياري) في الجداول رقم (2).

2.2. جمع السائل المنوي:

تم إجراء عملية جمع السائل المنوي مرتين أسبوعياً باستخدام المهبل الصناعي من ستة كباش (أغنام العواس)، تراوحت أعمارها بين 3-6 سنوات. تم الحصول على أربع قذفات من كل ذكر (24 قذفة) خلال موسم التناسل.

فحص السائل المنوي بعد كل عملية جمع لتقييم نوعية السائل المنوي وملائمته للتجميد عن طريق التقييم العياني والذي يتضمن (الحجم، اللون والقوام)، والتقييم المجهري الذي يتضمن (الحركة الجماعية، الحركة الفردية، الصباغة الحية بصبغة الأيوزين-نيكروزين والتركيز باستخدام جهاز مقياس اللون الضوئي) (الجدول رقم 1). استعملت في التجميد فقط القذفات التي كان تركيز النطاف فيها أكثر من 2×10^9 نطفة / مل والحركية أكثر من 70 %.

3.2. خطوات تجميد السائل المنوي:

يمدد السائل المنوي بعد الجمع مباشرةً ويوزع في أنابيب سعة 15 مل على الدرجة 37 مئوية في محاليل الحفظ المختلفة المدروسة بتركيز نهائي قدره 400×10^6 نطفة / مل. تترك الأنابيب لمدة 10 دقائق على الدرجة 34 مئوية.
للحد من مخاطر الصدمة الحرارية، يبرد السائل المنوي ببطء من الدرجة 30 مئوية إلى الدرجة 4 مئوية بمعدل نصف درجة بالدقيقة، يعبأ السائل المنوي المخفف في قشات من كلوريد البولي فينيل سعة 0,5 م(I.M.V., l'Aigle, France) على الدرجة 4 مئوية.

تترك القشات على الدرجة 4 مئوية لمدة ساعتين من أجل التوازن. ثم يعلق الحامل الحاوي على القشات بشكل أفقي فوق بخار الآزوت على ارتفاع 4 سم من سطح السائل الآزوتي (-140 درجة مئوية) لمدة عشر دقائق قبل أن تغطس مباشرةً في السائل الآزوتي (– 196 مئوية) من أجل التخزين.
تقيم بعد ذلك نوعية السائل المنوي مباشرةً بعد التجميد بقياس نسبة النطاف الباقية على قيد الحياة وقياس الحركية الفردية بعد إذابة قشة واحدة لكل محاولة على الدرجة 37 مئوية بحمام مائي لمدة 30 ثانية.

4.2. التحليـل الآلـي للسائـل المنـوي:

لمقارنة النتائج بين ممددات التجميد المختبرة والممدد الشاهد، حللت قشتان من كل ممدد بمساعدة نظام تحليل السائل المنوي الـ CASA 3.5 Sperm Vision® (Minitüb, Tiefenbach, Allemagne).
المؤشرات المقيمة هي: الحركية (MOT-%)، الحركية التقدمية (PROG- %)، السرعة الخطية المنحنية VCL (Curvilinear Line Velocity-µm/s)، السرعة الخطية المستقيمة أو التقدمية VSL (Staight Line Velocity- µm/s)، دليل الخطية LIN (Linearity Index – %)، المدى الجانبي لضربات الرأس ALH (Lateral Head

(Displacement–µm/s، مسافة الخط المستقيم Distance Straight Line– µm/sec)DSL) ومتوسط السرعة التقدمية: VAP (Average Path Velocity–µm/s) (Stephens *et al.*, 1988 ; Renard *et al.*, 1996).

3-التحليل الإحصائي Statistical analysis:

يعبر عن النتائج بالمتوسط ± الخطأ المعياري (SEM). عولجت المعطيات باستعمال برنامج Stat View IIND(مفاهيم معداد، بيركلي، الولايات المتحدة الأمريكية). استعمل اختبار ANOVA لدراسة تأثير التراكيز المختلفة من الغلوتامين في نتائج التحليل الآلي للسائل المنوي. اعتبرت قيم p <0.05 إحصائياً معنوية.

4-النتائـــج :Results

آ-مواصفات السائل المنوي وقيم الضغط الأسموزي لأوساط التمديد المستخدمة:

أشارت نتائج جمع السائل المنوي إلى عدم وجود أية فروق معنوية في مواصفات السائل المنوي لقذفات الكباش الستة والمتمثلة باللون حيث تراوح بين الحليبي إلى الأبيض الكريمي، وحجم القذفة والتركيز ونسبة الحيوية ونسبة النطاف الميتة (الجدول رقم 1).

الجدول رقم (1): مواصفات السائل المنوي (المتوسط ± الانحراف المعياري) في ذكور أغنام العواس.

رقم الكبش	حجم القذفة (مل)	التركيز (مليار/مل)	الحيوية (%)	النطاف الميتة (%)
1	1.3±1.56	0.8±2.32	75	18
2	0.7±1.76	0.5±2.85	75	19
3	0.4±1.81	1.9±2.68	85	15
4	0.8±1.82	1.5±3.55	85	14
5	1.2±1.66	0.7±1.95	75	17
6	1.1±1.86	1.6±2.42	80	19
المتوسط العام	**0.9±1.75**	**1.7±2.63**	**4.9±79.2**	**2.1±17**

ويشير الجدول رقم (2) إلى عدم وجود أية فروق معنوية (p>0,05) في قيم الضغط التَناضُحِيّ أو الأسموزي لممدد التجميد الشاهد (التريلاديل) والممدات الأخرى المضاف إليها تراكيز مختلفة من الحمض الأميني الغلوتامين.

الجدول رقم (2): قيمة الضغط التَناضُحِيّ (المتوسط ± الانحراف المعياري بـ $mOsm/kgH_2O$) لممدد التجميد الشاهد (CM) المضاف له تراكيز مختلفة من الغلوتامين (mMol /ml G).

الممدد الشاهدCM	CM + 10G	CM + 20G	CM + 30G	CM + 40G	CM + 50G
1320,4±3,4	**1332,2±5,2**	**1346,6±3,6**	**1364,2±3,5**	**1376,3±9,4**	**1387,1±2,9**

الممدد الشاهد: التريلاديل+ 20 % من صفار البيض + 6,4 % (v/v) غليسرول.

ب- تحليل حركية السائل المنوي:

يبين الجدول رقم (3) تأثيرات إضافة الغلوتامين بتراكيز مختلفة (10، 20، 30، 40، 50) إلى الممدد المرجعي (الشاهد) في حركية وصفات حركية النطاف المجمدة والمذابة والمحللة بجهاز التحليل الآلي للقذفات المستخدمة من ست ذكور من أغنام العواس داخل الموسم التناسلي.

يلاحظ من نتائج التحليل الآلي للقذفات المستعملة في هذه التجربة أن الغلوتامين يحسن بتركيز 20 ميلي مول/مل بشكل معنوي ($p<0.05$) حركية النطاف والسرعة الخطية المنحنية VCL والمسافة الخطية المستقيمة DSL بالمقارنة مع الممدد المضاف له الغلوتامين بتراكيز 10 و30 و40 و50 ميلي مول/مل والممدد الشاهد.

ويحسن إضافة الغلوتامين بتركيز 20 ميلي مول/مل ولكن بشكل غير معنوي (VSL وVAP) بالمقارنة مع إضافة الغلوتامين بتراكيز 10 و30 و40 و50 ميلي مول/مل والممدد الشاهد وبالتالي يحسن إضافة الغلوتامين بتركيز 20 ميلي مول مؤشرات الحركية ومؤشرات الحركية الفردية السابقة الذكر للنطاف بالمقارنة مع التراكيز الأخرى والممدد الشاهد.

الجدول رقم (3): تأثير إضافة الغلوتامين بتراكيز مختلفة إلى الممدد المرجعي (الشاهد) على الحركية الجماعية والحركية التقدمية (PROG) وصفات حركية النطاف المجمدة والمذابة والمحللة عبر جهاز CASA (متوسط ± انحراف معياري).

المؤشر المدروس	الممدد الشاهد CM	CM + 10G	CM + 20G	CM + 30G	CM + 40G	CM + 50G
الحركية(%)	66.2±6.9b	65.8±8.3b	70.6±8.5a	67.4±13.5	69.1±7.5	67.3±10.5
PROG(%)	51.70±2.18	47.23±2.82	54.73±2.98	51.54±4.49	53.24±2.30	49.33±3.81
VCL (µm/s)	86.2±9.5 ab	82.7±9.2b	90.5±8.6a	86.3±10.1ab	86.4±6.9ab	83.6±11.3ab
VSL (µm/s)	38.8±2.7	37.4±2.9	40.3±1.3	38.8±1.7	39.4±2.5	38.1±3.3
LIN(%)	0.5±0.03	0.5±0.04	0.4±0.03	0.5±0.04	0.5±0.02	0.5±0.02
ALH (µm)	6.2±0.4	6.3±0.5	6.5±0.5	6.4±0.5	6.3±0.4	6.22±0.5
VAP (µm/s)	53.03±4.9	50.96±4.03	54.9±3.6	52.7±3.8	53.4±3.2	51.7±5.2
DSL (µm/s)	15.84±1.05ab	15.51±1.27b	16.65±0.63a	16.05±0.83ab	16.48±0.11ab	15.70±1.32ab

VCL: السرعة الخطية المنحنية ؛ **VSL**: السرعة الخطية المستقيمة أو التقدمية ؛ **LIN**: خطية المسار أو المسار الحقيقي ؛ **ALH**: المدى الجانبي لضربات الرأس ؛ **VAP**: متوسط السرعة التقدمية ؛ **DSL**: المسافة الخطية المستقيمة. النتائج ذات الأحرف المختلفة في نفس السطر هي مختلفة معنوياً ($p<0,05$).

5-المناقشة:Discussion

نظراً لأن الأغنام من الحيوانات الموسمية التناسل، تمت دراسة تأثير الحمض الأميني الغلوتامين في حيوية وحركية النطاف داخل الموسم التناسلي حيث هدفت هذه الدراسة إلى تحديد ممدد تجميد يحفظ السائل المنوي لكباش العواس بجودة مطابقة أو أعلى للممددات التجارية بإضافة تركيز محدد من هذا الحمض الأميني، أوضحت النتائج (الجدول رقم 1) بأن مواصفات السائل المنوي المظهرية لذكور أغنام العواس لاتختلف فيما بينها في حجم القذفة، والتركيز، واللون، كما لوحظ عدم وجود فرقاً معنوياً في حيوية النطاف، ونسبتها الميتة عند الجمع بين الذكور المستخدمة، ويعزى ذلك إلى أن أوزانها وأعمارها متقاربة، وظروف الرعاية نفسها، وجميعها منتخبة وراثياً لتكون طلائق تلقيح اصطناعي.

وبينت النتائج أيضاً (الجدول رقم 2) عدم وجود أية فروق معنوية ($p>0,05$) في قيم الضغط الأسموزي لممدد التجميد الشاهد (التريلاديل) والممدات الأخرى المضاف إليها تراكيز مختلفة من الحمض الأميني الغلوتامين مع الإشارة إلى وجود زيادة طفيفة في قيمة الضغط التَناضُحِيّ مع زيادة تركيز الغلوتامين وهذا ماتم ذكره في دراسات سابقة إذْ بيّن (Ali Al-Ahmad *et al.*, 2008) أن إضافة الغلوتامين إلى ممدّد التجمّيد الشاهد أدى الى زيادةً في الضغط التَناضُحِيّ، والذي يزداد بإطراد مع زيادة التركيز، وكذلك بينت (Amirat-Briand *et al.*, 2009) أن إضافة الغلوتامين بتراكيز مرتفعة إلى ممدد التجميد يرفع الضغط الأسموزي للممدد الأمر الذي يبين التأثير السام للغلوتامين بتراكيز مرتفعة على حركية النطاف المجمدة والمذابة ، وأكد (Trimeche *et al.*, 1996[a]) أن أي تعديل أو تغيير في الضغط التَناضُحِيّ يعد عاملاً مهماً يؤخذ بالحسبان عند تمديد محلول التجميد بسبب حساسية النطاف للضغوط التَناضُحِيّة المرتفعة.

وفي هذه الدراسة أيضاً أظهر الجدول رقم (3) أن التركيز الأمثل للغلوتامين والذي يمكن إضافته داخل الموسم التناسلي هو 20 ميلي مول/مل والذي حسن وبشكل معنوي ($p<0.05$) بعض مؤشرات الحركية للنطاف عند كباش العواس كالحركية و الـ VCL و الـ VSL، وهذه النتائج تتفق مع نتائج الدراسة التي قام بها (Ali Al-Ahmad *et al.*, 2008) اللذين وجدوا أن التركيز المناسب للغلوتامين في محاليل تمديد السائل المنوي للماعز (25) ميلي مول حيث حسن بشكل معنوي ($p<0.05$) حركية النطاف و الـ VCL و الـ VSL مقَارنَةً بالممدّد الأساسي الذي لا يحتوي على الغلوتامين.

وهذا التركيز أعلى من ذلك المستخدم عند الثيران والمقدر بـ 10 ميلي مول (Moussa *et al.*, 2002; Amirat-Briand *et al.*, 2009)، لكنه أقل من التركيز المستخدم عند الحصان والمقدر بـ 30 ميلي مول (Trimeche *et al.*, 1999)، أو 50 ميلي مول (Khlifaoui *et al.*, 2005)، وأيضاً عند الإنسان (Renard *et al.*, 1996)، والحمار (Trimeche *et al.*, 1996[a]) والمقدرة بـ 80 ميلي مول، وبينت دراسات أخرى أن إضافة (40 أو 70) ميلي مول من الغلوتامين كان أكثر فعالية لحفظ السائل المنوي المجمد عند الإنسان (Lalonde *et al.*, 1991)، والحصان (Trimeche *et al.*, 1999) على الترتيب.
كما أوضح (Trimeche *et al.*, 1996[b]) أن التأثيرات الوقائية للغلوتامين والبرولين كانت واضحة عندما استخدم مدى واسع من التراكيز (10 وحتى 80) ميلي مول، بالمقابل بين (Sanches-Partida *et al.*, 1992) أن التراكيز المرتفعة للأحماض الأمينية تسبب أذيات خلوية للنطاف عند الكباش.

وبينت أيضاً (Khlifaoui *et al.*, 2005) أن الأحماض الأمينية أصبحت تستخدم في ممددات التجميد كواقيات من صدمة البرد للسائل المنوي عن طريق الحد من التأثيرات الخلوية السامة لواقيات البرودة التقليدية.

وعلى أية حال فإن استخدام الغلوتامين لوحده يعطي حركية منخفضة بينما تأثيره يتحسن عند إشراكه مع واقيات البرودة الأخرى مثل الغليسيرول والبروبلين غليسيرول في ممددات تحتوي صفار البيض او جزيئات مستخلصة من صفار البيض مثل الـ LDL (Amirat–Briand *et al.*, 2009).

ولكن السؤال الذي يطرح نفسه ماهي آلية عمل هذه الأحماض الأمينية لحماية النطاف في أثناء عملية التجميد والإذابة؟ لتفسير هذه الآلية، طورت عدة فرضيات لتوضيح دور الأحماض الأمينية في حماية النطاف في أثناء عمليتي التجميد والإذابة، فقد بين كلاً من(Noguchi and Matsmuto, 1971) أن غلوتامات الصوديوم تحمي بعض الأنزيمات في النطفة.

وأثبت (Lalonde *et al.*, 1991) أن بعض الأحماض الأمينية تحمي بالمشاركة مع الغليسيرول أنزيم Calcium ATPase في أثناء عملية التجميد، ووضح (Carpenter and Crow, 1988) أن البرولين يقوم بحماية أنزيم فوسفوفركتوكيناز من الانفصال أو التمسخ (Denaturation)، وبعضها تحمي أنزيم نازعة هيدروجين الكحول (Heinz *et al.*, 1990)، وأنزيم نازعة هيدروجين اللاكتات (Carpenter and Crow, 1988).

وقد اقترح (Kundu *et al.*, 2001) أن الأحماض الأمينية كجزيئات مشحونة يمكن أن تتفاعل بشكل كهربائي ساكن مع المجموعات الفوسفاتية لليبيدات الفوسفورية الغشائية مما يؤدي إلى تشكل طبقة مغطية للغشاء السيتوبلاسمي تحميه من صدمات البرد، وعززت هذه الظاهرة بدراسة على حركية دخول الغلوتامين الموسوم بمادة متألقة C^{14}glutamine–L والتي تقترح أن فعل الغلوتامين يمكن أن يكون خارج خلوي (Trimeche *et al.*, 1996[a]).

وأوضح (Trimeche *et al.*, 1996[b]) أيضاً أن الغلوتامين وصفار البيض يلعبان دوراً تآزرياً، فمن هنا كانت أهمية مشاركة الواقيات من صدمة البرد التقليدية مع الأحماض الأمينية والتي تلعب دوراً مهماً في منع حدوث هذه الأذيات الناتجة عن عملية التجميد وإعادة التذويب، وقد قام العديد من العلماء والباحثين بإجراء دراسات مكثفة على هذه الأحماض الأمينية لتحديد دورها في الوقاية من صدمة البرد، فكان موضوع العديد من الدراسات منذ 20 سنة مضت تركز على تأثير الأحماض الأمينية في تجميد نطاف الحيوانات الثديية.

إن اللجوء إلى تحليل السائل المنوي بمساعدة الحاسوب (CASA) هي تقنية اختبارية ومجهرية تسمح بمقارنة المعايير الحركية وجودة السائل المنوي للحيوانات المختلفة، فقد استخدم هذا الجهاز لتمييز النطاف المتحركة، والساكنة، وتصنيفها على أساس سرعة مسار كل نطفة متحركة، وأبعاد مسارها (Holt and Palomo, 1996 ; Joshi *et al.*, 2003 ; Kumar *et al.*, 2009) وتقييم خصائص الحركية الجماعية، ومؤشرات الحركية الفردية للنطاف بعد التجميد.

وبينت النتائج (الجدول رقم 3) وجود تأثير معنوي ($p<0.05$) لتركيز الغلوتامين 20 ميلي مول/مل على الحركية وبعض مؤشراتها. وبلغت الحركية الجماعية (MOT) 70.6 % مقابل 65.8 في الممدد المضاف إليه 10 ميلي مول و 66.2 % في الممدد الشاهد. وبلغت السرعة الخطية المنحنية (VCL) في محلول التمديد المضاف له 20 ميلي مول غلوتامين إلى 90.5 ميكرومتر/ثانية.

ومعظم المؤشرات التي تميز سرعة النطاف مثل VAP، VSL، وLIN ترتبط بقدرتها الإخصابية، فكلما زادت هذه المؤشرات، زادت الكفاءة الإخصابية للنطاف عند الكباش (Vertegen *et al.*, 2002).

وتأثر معدل سرعة المسار (VAP) بنوع محلول التمديد حيث وصل إلى 54.9 ميكرومتر/ثانية في محلول التمديد المضاف له 20 ميلي مول غلوتامين مقابل المحاليل الأخرى المدروسة، وبلغت السرعة الخطية المستقيمة (VSL) 40.3

ميكرومتر/ثانية في المحلول المضاف له 20 ميلي مول غلوتامين. بينما لم يتأثر المدى الجانبي لضربات الرأس (ALH) وخطية المسار (LIN) بنوع محلول التمديد.

وأخيراً، يستنتج من هذه التجربة تحديد أفضل التراكيز وهو 20 ميلي مول /مل من الغلوتامين والتي يوصى بإضافتها إلى ممدد التريلاديل ®Triladyl المُضاف له 20 % من صفار البيض و6,4 % من الغليسيرول والمستخدم لتجميد للسائل المنوي عند كباش العواس السورية داخل الموسم التناسلي.

وتحتاج نتائج هذه الدراسة لأن تُؤكد بتجربة حقلية في الجسم الحي من خلال تلقيح مجموعة من الإناث لتقدير خصوبة السائل المنوي المجمد ثم المذاب في هذا الممدد المضاف له الغلوتامين بمعدل 20 ميلي مول ومقارنته مع الكفاءة الإخصابية للشاهد والذي لم يضاف له الغلوتامين.

شكر وتقدير

يشكر الباحث مدير محطة بحوث إزرع والعاملون فيها وخاصة الدكتور رسلان أبو رومية للمساعدة في تأمين المستلزمات الضرورية لإنجاح هذا العمل ومتابعته الجادة في كافة مراحل الدراسة.

6-المراجع العلمية:

- Ali Al-Ahmad, M.Z., Chatagnon, G., Amirat-Briand, L., Moussa, M., Tainturier, D., Anton, M., and Fieni, F., 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., Pickett, B., 1987. Principles of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. Equine Vet. Sci., 7: 145–173.
- Amirat-Briand, L., Bencharif, D., Vera-Munoz, O., Bel Hadj Ali, H., Destrumelle, S., Desherces, S., Schmidt, E., Anton, M., Tainturier, D., 2009. Effect of glutamine on post-thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low density lipoproteins) extender: Preliminary results, 71: 1209–1214.
- Carpenter, J., Crow, J., 1988. The mechanism of cryoprotection of protein by solutes. Cryobiology, 25: 244–255.
- Dhami, A.J., Shani K.L., 1994. Evaluation of different cooling rates, equilibration periods and diluents for effects on deep-freezing, enzyme leakage and fertility of Taurine bull spermatozoa. Theriogenology, 40: 1269–1280.
- Dhami, A.J., Shani, KL., Mohan, G., 1995. Role of prefreeze cooling holding times, dilutors and thaw rates in improving freezability and post thaw survival of bovine spermatozoa. Indian J. Anim. Reprod., 16: 117–120.

- Garner, D., 1991. Artificial insemination. In: Cupps PT (ed.), Reproduction in Domestic Animals. Academic Press, SanDiego, pp. 251-278.
- Holt, W.V., Palomo, M.J., 1996. Optimization of Acontinuous Real-Time Computerized Semen Analysis System for Ram Sperm Motility Assessment and Evaluation of four Methods of Semen Preparation. Reprod. Fertil. Dev., 8: 219-230.
- Heinz, K.A., Glofcheski, D.J., Lepock, J.R., Kruuv, J., 1990. Mechanism of Freeze-Thaw damage to liver alcohol dehydrogenase and protection by cryoprotectants and amino acids. Cryobiology, 27: 521-538.
- Iqbal N., Hunter A.G., 1991. Comparison of bovine sperm capacitations systems. J. Dairy Sci., 74: 228.
- Joshi. A., Naqvi, S.M.K., Bag, S., Dang, A.K., Sharma, R.C., Rawat, P.S., Mittal, J.P., 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., Katkova, N., Crister, J.K., Mazur, P., 1998. Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: Chemical toxicity v.s. osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. Cryobiology, 37: 325-338.
- Khlifaoui, M., Battut, I., Bruyas, J.F., Chatagnon, G., Trimeche, A., Tainturier, D., 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., Junnila, M., Katila, T., Soini, H., 1989. A preliminary study on the use of betaine as a cryoprotective agent in deep-freezing of stallion semen. J. Vet. Med., 39: 110-114.
- Kruuv, J, and Glofcheski, D.J., 1992. Protective effect of amino acids against freeze-thaw damage in mammalian cells. Cryobiology, 29: 291-295.
- Kumar, D., Joshi, A., Naqv, S.M.K., 2009. Effect of Post-Thaw Incubation on Semen Characteristics of Ram Spermatozoa Cryopreserved under Controlled and Uncontrolled Rate of Cooling. Anim. Reprod., 6(4): 526-534.
- Kundu, C.N., Das, K., and Majumder, G.C., 2001. Effect of amino acids on cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. Cryobiology, 41: 21-27.
- Lalonde, R., Lepock, J., Kruuv, J., 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.

- Li, Y., Si, W., Zhang, X., Ji, W., Dinnyes, A., 2003. Effect of aminoacids on cryopreservation of cynomologus monkey (Macaca fascicularis) sperm. Am. J. Primatol., 59(4): 159–165.
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., Anton, M., 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen–thawed bull semen. Theriogenology, 57(6): 1695–1706.
- Noguchi, S., Matsmuto, J., 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.
- Renard, P., Trimeche, A., Le pichon, J.P., Quero, J.C., Griveau, J.F., Chouteau, P., Tainturier, D., Le Lannou, D., 1996. Sperm mobility and flagellar motion: a comparison between boar and other mammalian species. In: reproduction in domestic animals, physiology, pathology, biotechnology-Boar semen preservation III. Brath D, Johnson & weite Ed, pp: 249-250.
- Sanchez-Partida, L., Maxwell, W., Paleg, L., Setchell, B., 1992. Proline and glycine betaine in cryoprotective diluents for ram spermatozoa. Reprod. Fertil. Dev., 4: 113–118.
- Stephens, D., Hickman, R., Hoskins, D., 1988. Description, validation, and performance characteristics of a new computer-automated sperm motility analysis system, Biol. Reprod., 38: 577-586.
- Trimeche, A., Renard, P., Le Lannou, D., Barriere, P., Tainturier, D., 1996a. Improvement of motility of post-thaw Poitou jackass sperm using glutamine. Theriogenology, 45: 1015–1027.
- Trimeche, A., Renard, P., Tainturier, D., 1996b. La glutamine: un nouveau cryoprotecteur pour congeler le sperme. Modèle d'étude: le baudet du Poitou. Bull Acad. Vêt. de France, 69: 447–454.
- Trimeche, A., Yvon, J., Vidament, M., Palmer, E., Magistrini, M., 1999. Effects of glutamine, proline, histidine and Betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. Theriogenology, 52: 181-191.
- Vertegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K., 2002. Computer Assisted Semen Analyzers in Andrology Research and Veterinary Practice. Theriogenology, 57: 149-179.