فسلجة التناسل والتلقيح الاصطناعي

(عملي)

المرحلة الثالثة – قسم الانتاج الحيواني

كلية الزراعة – جامعة تكريت

تخفيف السائل المنوي Semen Dilution

الدرس العملي الخامس : تحضير محاليل تخفيف السائل المنوي

ان من الاهداف الرئيسية للتلقيح الاصطناعي هو الاستخدام الاعظم للذكور ذات الكفاءة الوراثية الممتازة والخالية من الامراض . ولتحقيق ذلك لابد من الاحتفاظ بالقدرة الاخصابية القصوى للنطف لمدة من الزمن بعد جمعها . ولما كان حفظ السائل المنوي يعني المحافظة على المادة الوراثية للنطفة ، فانه لابد من توفير وسط مناسب لحفظ النطف خصوصا وان البلازما المرافقة النطف لا تفيد بحفظ النطف على اية درجة حرارة اكثر من ساعات معينة . ويشترط في وسط الحفظ ما يلي :-

1- ان يحتوي على مواد غذائية تعد مصدرا للطاقة .

2- ان يحتوي على مواد واقية تحمي النطف من الصدمات الحرارية الباردة .

3- ان يحتوي على محلول واق Buffer يحافظ على درجة حموضة الوسط ضمن حدود معينة (Ph=6-8) .

4- ان يحتوي على مضادات حيوية تمنع نمو البكتريا .

5- ان يحافظ على توازن الضغط الازموزي والايوني .

6- ان يزيد من حجم السائل المنوي ويحمي النطف من تاثير عملية التجميد .

7- ان يكون سهل التحضير ، ومواده متوفرة محليا ، ورخيص الثمن .

يكمن **الهدف الأول** لمحلول التمديد في تمديد السائل المنوي وزيادة حجمه لدرجة يمكن تلقيح / مثلا (300-1000) بقرة من قذفة منوية واحدة ، و**الهدف الثاني** هو حفظ السائل المنوي والاطالة من حياة النطف .

تركيب محلول التخفيف Composition of Extender or Diluent

يختلف محلول التمديد من بلد لآخر ، وحتى من مختبر الى آخر في البلد الواحد ، وفي الحقيقة لا يوجد حتى الان محلول تمديد مثالي يمكن التقيد به ، وما يجب ان نفهمه هو ان محاليل التمديد يشترط فيها ان تحوي على المكونات الأساسية التي تحقق الخصائص سابقة الذكر . ومن المكونات الشائعة في تركيب هذه المحاليل مايلي :-

1- سكر الجلوكوز أو الجالاكتوز أو الفركتوز التي تفيد كمصدر للطاقة .

2- صفار البيض أو الحليب المغلي مسحوب الدسم أو كامل الدسم ، وذلك كمواد تفيد ليس في كونها مصدرا غذائيا جيدا فحسب ، بل ايضا تفيد في حماية النطف من الصدمات الحرارية الباردة نظرا لغناها في مادة الليبوبروتين Lipoprotein والليسيثين Licithin .

3- محلول واحد أو منظم لدرجة الحموضة ، ويحافظ عليها لتكون قريبة من التعادل . ومن اشهر هذه المحاليل سترات الصوديوم أو فوسفات الصوديوم أو املاح مركبة ، مثل الـ Tris . ويجب ان تحضر هذه المحاليل لتكون درجة حموضتها قريبة من التعادل ، وان يكون ضغطها الأوزموزي مساويا للضغط الازموزي الخاص بالبلازما المنوية (300 ميلليموزمول) .

4- مضـادات حيويـة ، مثـل البنسـلين Pencillin ، أو الستربتومايسـين Strepyomycin أو البوليمكسـن الكبريتـي Polymyxin –B Sulphate . وفي حالة تجميد السائل المنوي يجب اضافة مواد مانعة للتجميد مثل الجليسرول الذي يستخدم على نطاق واسع أو السكريات المعقدة .

I– محلول تمديد السترات مع صفار البيض Egg Yolk – Citrate Extender

عرفت السترات كمحاليل واقية تفيد في تمديد السائل المنوي وتم تطويره في جامعة كورنيل في الولايات المتحدة ليحتوي على صفار البيض ، واصبح استخدامه شائعا من قبل الكثير من جمعيات مد اولة السائل المنوي وتصنيعه . ويحضر كما يلي :-

أ- تحضير سترات الصوديوم :

1- يوزن(2.9 غرام) من سترات (خلات) الصوديوم $Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$ أو(3.6 غرام) من بلورات الصوديوم المائية ذات التركيب الكيميائي $Na_3C_6H_5O_7 . 5H_2O$.

2- توضع هذه المادة في انبوبة اختبار مدرجة ويضاف اليها ماء مقطر حتى التدريج (العلامة 100) فيصبح التركيز(2.9%) أو (3.9%) وعندما يراد تحضير كميات كبيرة مثلا(1000 ميلليلتر) محلول ، يحضر(800 ميلليلتر) من ماء مقطر في دورق كبير ، ويسخن حتى الغليان ، ثم يضاف (29 غرام) أو(36 غرام) من بلورات سترات الصوديوم ، وتخلط ثم يسمح للمزيج ان يبرد حتى درجة حرارة الغرفة ، وعندها تضاف كميات اخرى من الماء ليصل الحجم النهائي إلى(1000 مل).

3- تعاير درجة حموضة المحلول بحيث تكون في النهاية (pH=6.8)، ويقاس ضغطه الازموزي ليكون نحو (300 ميلليموزمول) .

4- يخلط المحلول بشكل كامل ، ويخزن في زجاجة بنية اللون في مكان مظلم على درجة حرارة الغرفة أو على درجة الثلاجة (5 م°) حتى الاستخدام . ويعد هذا المحلول فاعلا فقط لمدة اسبوعين ، عندها يجب تحضيره مرة ثانية .

من مزايا هذا المحلول انه يرتبط بعنصر الكالسيوم أو غيره من المعادن الثقيلة ، ويبعثر حبيبات الدهن في صفار البيض مما يجعل حقل الرؤية وحركة النطف الفردية تحت المجهر واضحة جدا .

ب – تحضير صفار البيض :-

يشترط بصفار البيض ان يحصل عليه من قطيع دجاج خال من الامراض ، وان يكون طازجا (يفضل بيض اليوم نفسه) . ويفضل عدم التنويع بمصدر البيض.

1- يغسل البيض في ماء فاتر ، ثم يشطف مباشرة بماء صنبور المياه ، واخيرا بماء مقطر ، ويفضل البعض ان يغسل البيض بعد الماء بكحول الايزوبروبيل Isopropyl أو كحول الايثيل (70 %).

2- توضع ورقة نشاف فوق انبوبة اختبار مدرجة

3- تكسر البيضة الى نصفين وينقل الصفار من نصف الى اخر مرات عديدة حتى يتم التخلص من البياض الذي يعد ساما لنطاف الحيوانات الزراعية نظرا لغناه ببروتين الالبومين .

4- يوضع الصفار فوق ورقة النشاف ، ويفجر الغشاء المحيط بالصفار مما يسمح للصفار بالارتشاح عبر ورقة النشاف ضمن الانبوبة المدرجة .

5- يرمى غشاء صفار البيض وتكرر العملية مرات عديدة حتى يتم الحصول على الحجم اللازم من صفار البيض .

ج – خلط صفار البيض مع سترات الصوديوم :

من اجل تجهيز حجم معين من المزيج مثلا(100 مل) . يخلط (20 مل) من صفار البيض مع(80 مل) من محلول سترات الصوديوم ، أي بنسبة(4:1) وقد لوحظ ان هذه النسبة تعطي نتائج جيدة ، ومشابهة لنسبة (1:1) لهذا لا ضرورة لاستخدام كميات كبيرة من صفار البيض . وهنا نريد ان نذكر بان تجهيز صفار البيض ن واضافته لسترات الصوديوم لا تتم ما لم يكون هناك رغبة اكيدة في تمديد السائل المنوي .

د – اضافة المضادات الحيوية :

تضاف المضادات الحيوية عادة عند تمديد السائل المنوي ، وذلك بهدف منع نمو البكتريا التي قد ترافق السائل المنوي أثناء الجمع ن والتي بدورها يمكن ان تنافس النطف بموادها الغذائية ، كما انها يمكن ان تكون مرضية ، فتنتقل الى الاناث الملقحة وتحدث تاثيراتها غير المرغوبة ومن اهم المضادات الحيوية المستخدمة عند تمديد السائل المنوي للثيران والتي كانت مفيدة في القضاء على جرثومة داء الضمات Vibrosin هي البنسلين (500 وحدة دولية لكل ميلليلتر سائل منوي) مع الستربتومايسين (1000 ميكروغرام / مل سائل منوي) مع Polymyxin – B الكبريتية بكمية البنسلين نفسها . يفضل اضافة المضاد الحيوي قبل (4.5 - 6)ساعات من استخدام أو تجميد السائل المنوي .

هـ - اضافة السكر :

يفضل البعض اضافة(1%) جلوكوز أو جالاكتوز أو فركتوز لمحلول التمديد وذلك كمصدر اضافي للطاقة علما ان صفار البيض نفسه يعد مصدرا جيدا للطاقة . وهنا نريد ان نذكر الى ان السكر الشائع وجوده في السائل المنوي عند الحيوانات المجترة هو الفركتوز ، لكن النطف تفضل الجلوكوز عنه .

II - -محلول تمديد الحليب Milk Extender Preparation

استخدم الحليب باشكاله المختلفة في تمديد السائل المنوي ، اذ وجد ان الحليب المتجانس كامل الدسم أو مسحوب الدسم ، وحليب البودرة أو الحليب المبستر يمكن استخدامها بدلا من السترات وصفار البيض في تمديد السائل المنوي .

ولكن يشترط في استخدام الحليب باي شكل من اشكال تواجده ، تسخينه لدرجة الغليان لمدة(10 دقائق) وذلك لابطال مفعول المواد الكيميائية ذات التاثير السام على النطف ، والتي ترتبط بالجزء البروتيني – الالبومين في الحليب ، واهمها مادة اللاكتنين Lactenin التي تعد ذات تاثير سام جدا على النطف عند عدم تسخين الحليب . واقترح العاملون في بنسلفانيا الخطوات التالية لتحضير الحليب عند استخدامه في تمديد السائل المنوي :

1- يسخن الحليب المستخدم باي صورة من صوره لدرجة (92 – 95 م°) لمدة عشر دقائق .

2- يرفع الحليب المسخن عن السخانة ويبرد لدرجة حرارة الغرفة .

3- يسكب الحليب البارد في وعاء معقم ويزال الدسم من على السطح واذا دعت الحاجة لإزالة الزبد بشكل اكثر ، يصفى الحليب من خلال قطعة قماش .

4- تضاف المضادات الحيوية للحليب قبل البدء باستخدامه في تمديد السائل المنوي .

اظهرت نتائج التجارب ان هناك تقاربا في نتائج الخصوبة ، ونسبة الحمل من أول تلقيحة عند مقارنة السائل المنوي الممدد بالحليب المسخن مع محاليل تمديد السترات أو الفوسفات الملحية .

وقد ظهرت العشرات من محاليل التمديد الاخرى ، ولكننا لسنا بصدد ذكرها الان بل نريد ان نؤكد ان النوعين السابقين من المحاليل هما الاكثر استعمالا وانتشارا في اقطار كثيرة من العالم اتخذت التلقيح الاصطناعي وسيلة اساسية في تلقيح قطعانها من الثروة الحيوانية .