فسلجة التناسل والتلقيح الاصطناعي

(عملي)

المرحلة الثالثة – قسم الانتاج الحيواني

كلية الزراعة – جامعة تكريت

الدرس العملي السادس : تخفيف السائل المنوي Dilution of Semen

ان أول ما يجب ان يهتم به عند تمديد السائل المنوي هو تجنب حدوث اية صدمة حرارية ، لهذا يجب ان تكون درجة حرارة محلول التمديد عند كل خطوة من خطوات مداولة السائل المنوي مساوية لدرجة حرارة السائل المنوي . ومن المفضل ان يحفظ قسم من محلول التمديد عند الجمع (37 مْ) في حمام مائي تكون درجة حرارته مساوية لدرجة حرارة السائل المنوي عند الجمع .

ويمدد عادة السائل المنوي الى معدلات تتناسب مع تركيز النطف في القذفة الواحدة ، ونسبة الحيوانات المنوية المتحركة وعدد النطف المرغوب توفرها في جرعة التلقيح (القشة) . وهذا بالطبع يختلف ليس فقط بين الانواع الحيوانية ، ولكن ايضا ضمن النوع الحيواني الواحد وحتى احيانا ياخذ طابعا فرديا ليختلف بين القذفات المنوية للحيوان الواحد . كما ان عدد النطف المطلوبة للتلقيحة الواحدة يمكن ان يختلف حسب مكان ايداع السائل المنوي بحيث يكون هذا العدد اقل كلما كان مكان الايداع اقرب الى مكان الاخصاب (الثلث العلوي من قناة المبيض) . وتختلف ايضا معدلات التمديد حسب طبيعة السائل المنوي . وعادة تكون معدلات التمديد للسائل المنوي غير المجمد اكبر من معدلات التمديد الخاصة بالسائل المنوي المزمع تجميده .

وطريقة التمديد اما ان تكون مباشرة ، وهذا ما هو شائع عندما تكون الرغبة في استخدام السائل المنوي بحالته السائلة وان تتم على مرحلتين عندما يزمع في استخدام السائل المنوي مجمدا . عندها يستخدم نصف معدل التمديد في البداية ويستكمل النصف الثاني من معدل التمديد عند اضافة الجليسرول .

ولقد اختلفت معدلات التمديد فتراوحت ما بين(1: 25) إلى (1: 250) سائل منوي (الثيران) لمحلول التمديد . وذلك يعتمد على تركيز النطف في القذفة ، وعلى حيوية النطف ونشاطها ، وايضا على عدد النطف الواجب توفرها في جرعة التلقيح . وهناك اتفاق عام بين المربين والعاملين في مجال التلقيح الاصطناعي على ان جرعة التلقيح (القشة) عند الثيران يجب ان تحوي ما بين (5 – 10 مليون) نطفة ، اذا استخدم السائل المنوي بحالته السائلة ، وان تحوي ما بين(15 – 40 مليون) نطفة قبل التجميد اذا استخدم السائل المنوي مجمدا على اعتبار ان نحو (40 – 50%) من النطف تموت خلال عمليات التجميد والاذابة . وفيما يلي شرح كامل لطريقة حساب معدل التمديد لسائل منوي يستخدم بصورته السائلة أو مجمدا .

طريقة حساب معدلات التمديد :

مثال : لنفترض ان حجم القذفة المنوية الماخوذة من ثور التربية هي (7 مل) ، وان تركيز النطف (وفقا لطريقة شريحة العد) كانت (1مليار مل) ، وان نسبة النطف المتحركة حركة تقدمية كانت(73 %) . وان عدد النطف المطلوب توفرها في قشة التلقيح هو(10 ملايين) عند استخدام السائل المنوي بصورته السائلة و(20 مليونا) عند استخدامه مجمدا .

المطلوب حساب معدل التمديد في كلا الحالتين :

1- نحسب عدد النطف المتحركة حركة تقدمية في كل ميلليتر سائل منوي ، وهذا يمكن معرفته كما يلي :

تركيز النطف × **نسبة النطف المتحركة** = 910 × 73 / 100 = 730 × 6 ^{10} نطفة م مل

2- معدل التمديد لكل ميلليلتر واحد عند استخدام السائل المنوي سائلا =

$$\frac{\text{ملليلتر تركيز النطف المتحركة في كل حركة تقدمية}}{\text{عدد النطف المطلوب توفرها في القشة}} = \frac{730 \div 10}{10 \div 10} = 73$$

4- معدل التمديد الكلي = 73 × 7 = 511 مل لسائل منوي تحوي فيه قشة التلقيح على 10 ملايين نطفة بكل ميلليلتر .

الدرس العملي السابع : حفظ او مداولة السائل المنوي وتصنيعه

تختلف عمليات مداولة السائل المنوي واجراءته باختلاف أوقات استخدامه . فاذا كان استخدام السائل المنوي سيتم مباشرة بعد الجمع ، فانه لا يحتاج اكثر من تمديده بمحلول سكري أو ملحي قبل استخدامه . واذا ما اريد تخزينه لمدة (24) الى (48) ساعة وحفظه على درجة حرارة الغرفة ، فقد استخدمت عديد من محاليل التمديد لهذا الغرض .

1 - مداولة السائل المنوي على درجة حرارة الغرفة وحتى (5 م ْ)

تعد نيوزلندة من اكثر دول العالم استخداما لهذا النوع من الاجراء فهم يلقحون ابقارهم غالبا بسائل منوي ممدد بحالته السائلة وذلك بسبب قصر طول موسم التلقيح ، وتوفر اعداد هائلة من الأبقار خلال تلك الفترة . وقد طوروا نوعا خاصا من محلول التمديد ، اطلقوا عليه اسم Carpogen الذي يتالف من محلول سترات واق مع صفار البيض المشبع بغاز الآزوت ، والمضاف اليه حامضCapoic acid .

وتشير نتائج التقارير الى ان نسبة اللاعودة للشبق من التلقيحة الأولى بعد(49 يوما) من التلقيح كانت (68 %) . وان اكثر من مليون بقرة تلقح ما بين سبتمبر / ايلول وديسمبر / كانون ال أول كل عام لهذا النوع من التقانة ، وكان افضل درجة حرارة لحفظ السائل المنوي الممدد بهذا المحلول هي (18 -25 م ْ) . ونريد ان ننوه الى اية عملية تمديد للسائل المنوي يجب الا تتم الا بعد نصف ساعة من وقت الجمع ، وذلك كوقت ضروري يسمح من خلاله النطف ان تتفاعل مع البلازما المحيطة التي تضاف اغلبها من الغدد الجنسية الثانوية عند القذف . كما يجب ان تكون درجة حرارة المحلول الممدد مساوية تماما لدرجة حرارة السائل المنوي .

اما اذا اريد حفظ السائل المنوي بحالته السائلة لعدة ايام ، فلا بد من تبريده تدريجيا لدرجة حرارة الثلاجة (5 م°) ولتحقيق ذلك تتبع الخطوات التالية:

1- ترك السائل المنوي الموجود بانبوبة الجمع ضمن حمام مائي ، تكون درجة حرارته مساوية لدرجة حرارة السائل المنوي نفسه لمدة نصف ساعة .

2- تقوم حيوية السائل المنوي للمرة الثانية وفي حال كونه جيدا يمدد بمحلول التمديد المجهز والمخزن في حمام مائي تكون درجة حرارته عند التمديد مساوية لدرجة حرارة السائل المنوي . وهنا يفضل ان تكون نسبة التمديد (3 – 4 مرات) اي (1 : 3 او 1 : 4) وذلك كتمديد اولي .

3- يترك المزيج على درجة حرارة الغرفة ضمن دورق يحوي على ماء درجة حرارته مساوية لدرجة حرارة المزيج ، و ذلك لمدة نصف ساعة كوقت يسمح من خلاله للنطاف بان تتاقلم ، و تتوازن مع المحلول الممدد من جهة ، كما يسمح للمضادات الحيوية المتوفرة في محلول التمديد ان تزيد من فاعليتها من جهة اخرى .

4- يبرد بعد ذلك السائل المنوي الممدد تدريجيا لدرجة حرارة الثلاجة (5^0م°) . حيث تستغرق هذه العملية تقريبا ساعتين ، و قد استطاع سلهب (1987) من ايجاد طريقة جديدة للتبريد سميت **الطريقة الخطية Linear Cooling Profile** بحيث تمكننا من الوصول لهذه الدرجة من الحرارة (5^0م°) بمدة نصف ساعة دون ان تتاثر حيوية و درجة نشاط النطاف .

5- يمدد السائل المنوي الى صورته النهائية بالمحلول الممدد نفسه الذي استخدم سابقا ، لكن يجب ان يكون مخزنا على درجة حرارة الثلاجة . و قد امكن حفظ السائل المنوي بهذه الطريقة لعدة لعدة ايام دون ان يكون هناك تغير كبير في القدرة الاخصابية للنطاف .

2 - تجميد السائل المنوي وحفظه على درجة حرارة(– 196 م ْ) :

اصبح تداول السائل المنوي بشكله المجمد الطريقة الوحيدة في كثير من الدول المتقدمة ، وقد استعمل في الخمسينات من القرن الماضي غاز الفحم الصلب (الثلج الجاف) أو الكحول في تجميد السائل المنوي لدرجة حرارة(– 76 م ْ).

ثم استخدم السائل الهوائي ، لكن بحكم كونه يسمح بتجميع ال أوكسجين الذي بدوره يكون قابلا للانفجار عند تراكمه ، فان استعماله كان محدودا . وما ان عرف السائل الازوتي حتى اصبح الطريقة الوحيدة في كثير من دول العالم كوسيط ليس فقط لتجميد السائل المنوي بل ايضا لتخزينه على درجة حرارة(– 196 م ْ) ، والسماح بنقله عبر المحيطات .

ونظرا لكون النطاف تتاثر مورفولوجيا ووظيفيا بدرجات الحرارة المنخفضة ، فقد كان لمعرفة الغليسرول ومشابهاته من موانع التجميد الاثر الاكبر في نجاح عمليات التجميد العميق للسائل المنوي لبعض الانواع الحيوانية ، وخاصة الثيران . لكن الغليسرول يعد الاكثر شيوعا نظرا لقدرته على اختراق جدار النطفة ، وبالتالي الاتحاد مع جزيئات الماء الموجودة داخل الخلية ، ومنع تكوين بللورات ثلجية ، وكذلك نظرا لقدرته في تخفيف اثر تركيز المحلول عند تجميد جزيئاته في البيئة المحيطة بالنطاف . وقبل التحدث بالتفصيل عن الاجراءات الخاصة بتجميد السائل المنوي وتخزينه ، لابد من تبيان الاختلاف في وجهات النظر بين العلماء حول وقت ودرجة حرارة وطرق اضافة الغليسرول .

3 - اضافة الغليسرول للسائل المنوي :

يعود الفضل الأول في استخدام الغليسرول كمانع لتجميد النطاف الى العلماء الانكليز ، وعادة يضاف الغليسرول للسائل المنوي المراد تجميده على درجة حرارة (5 م°)، والكثير من الدراسات لا تفضل اضافته على درجة حرارة اعلى من ذلك . لكن تبين ان الامر مرهون بنسبة الغليسرول المستخدمة . حيث انه يمكن اضافة الغليسرول الممزوج مع محلول الممدد بنسبة (3 %) الى السائل المنوي الممدد تمديدا أوليا بمحلول التمديد نفسه ، وذلك على درجة حرارة الغرفة دون حدوث تاثيرات ضارة على نطاف الثيران شريطة ان يتم تبريد السائل المنوي الممدد والمضاف اليه الغليسرول لدرجة حرارة(5 م°) خلال فترة (30 دقيقة). وعادة يضاف الغليسرول بنسبة (6- 8 %)على درجة حرارة(5 م°) عندما يستخدم صفار البيض بنسبة (10 %) وعندما يستخدم الحليب المتجانس كمواد غذائية وحامية للنطاف من تاثير عملية التبريد الأولى .

كما استخدمت عدة طرق لاضافة الغليسرول ، فبعض الباحثين يفضل اضافته دفعة واحدة ، لكن تبين ان ذلك يمكن ان يسبب صدمة حلولية للنطاف ولهذا فان الاغلبية من الباحثين يفضلون اضافته بصورة تدريجية Step-Wise ومحكمة بحيث يستخدم مربع بيرسون Person s Square لحساب نسبة اضافته للسائل المنوي الممدد ، وذلك عند كل مرحلة من مراحل اضافته والتي عادة يفصل بينها فاصل زمني قدره(15 دقيقة) ، ولمدة ساعة .

يوصف الغليسرول حاليا بان له اثار سلبية ، وضارة على النطاف بعد عملية الاذابة ووضع النطاف في القناة التناسلية الانثوية . حيث تبين ان كثيرا من النطاف تنفجر ضمن القناة التناسلية الانثوية ، مما يقلل من فرصة الاخصاب . وعزي هذا السبب الى ظاهرة الفرق في الضغط الحلولي Hypo Osmobiosis التي تفيد بان سرعة دخول سائل القناة التناسلية الانثوية في جسم النطفة تكون اكبر من خروج الغليسرول ؛ مما يؤدي الى انتفاخ النطفة وانفجارها . ولهذا فهناك اتجاهات حديثة للبحث عن مادة تفيد مثل الغليسرول في حماية النطاف أثناء عملية التجميد لكن غير ضارة بعد الاذابة ، وعند التلقيح . وقد تم تخفيف اثر هذه الظاهرة وذلك من خلال الاقلال من تركيز الغليسرول المستخدم (3%) بدلا من (8%) وثانيا بالسماح للنطاف المذابة بالبقاء فترة (10 دقائق) من اجل اعادة التوازن قبل وضعها في جسم الانثى .