Journal of Animal and Poultry Production

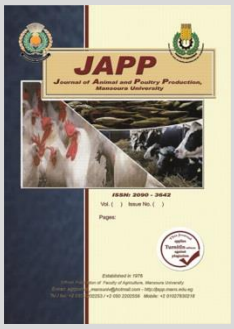
Journal homepage: www.japp.mans.edu.eg
Available online at: www. jappmu.journals.ekb.eg

Impact of Zeolite Addition in Semen Extender on Rabbit Sperm Quality after Cryopreservation

Mohammed, A. K.[1] ; W. A. Khalil[2]* ; Sh. A. Gabr[1]; M. E. Hammad[1]; Hanan F. Youssef [3] and A. Z. Mehrez[2]

[1]Animal Production Department, Faculty of Agriculture, Tanta University, Egypt.
[2]Animal Production Department, Faculty of Agriculture, Mansoura University, Mansoura, Egypt.
[3]Ceramic Department, Inorganic Chemical Industries & Mineral Resources Division, National Research Centre, Egypt

Cross Mark



ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of adding zeolite mineral in semen extender on rabbit sperm cryopreservation. Ten healthy, fertile rabbit bucks were used, and the ejaculates were obtained using an artificial vagina. Semen of all bucks were pooled and diluted in a tris-yolk fructose (TYF) extender supplemented with zeolite at concentration of 0 (control) and 1% (*w/v*) for a final sperm concentration of 25 x 106 sperm cells/ ml. Diluted semen was packed in straws (0.25 ml) and stored in liquid nitrogen (-196 °C) for one month. After thawing, semen of each treatment was evaluated for sperm quality parameters, including sperm progressive motility, livability, morphological abnormalities and plasma membrane integrity. Apoptosis and sperm ultrastructure were also examined. Total antioxidant capacity and lipid peroxidation markers were determined in extender after thawing. Results showed that zeolite had a positive effect ($P < 0.05$) on sperm characteristics (progressive motility, livability and membrane integrity) after equilibration period and post-thawing as compared with the control. Percentage of viable sperm increased ($P < 0.05$), while percentages of early apoptotic, apoptotic and necrotic sperm cells decreased ($P < 0.05$) in treatment of zeolite as compared to control. In contrary, total antioxidants capacity in extender decreased ($P < 0.05$) and malondialdhyde and H_2O_2 concentration increased ($P < 0.05$) in treatment of zeolite compared to control. In conclusion, addition of semen extender with zeolite improved post-thaw sperm quality of rabbit by enhancing sperm characteristics, reducing apoptosis and sperm damage occurring by cryopreservation.

Keywords: Zeolite, semen, cryopreservation, rabbit

المقدمة

تعتبر برامج التلقيح الصناعي ضرورية للتربية وإختيار البرامج التي تهدف إلى زيادة إنتاج الأرانب. ومع ذلك، فإن قدرة الحيوانات المنوية على البقاء في المختبر بعد التخزين بالتبريد (Khlifaoui *et. al.*, 2005; Rosato and Iaffaldano 2011; Sarıözkan *et. al.*, 2012) أو الحفظ بالتجميد (Mocé and Vicente 2009) تكون محدودة. وبالتالي، فإن بروتوكولات التلقيح الصناعي تتضمن إستخدام السائل المنوي الطازج أو المبرد لفترة وجيزة حتى تعطى نتائج مماثله لتلك التي تنتج من التلقيح الطبيعي (Roca *et. al.*, 2000; López-Gatius *et. al.*, 2005). ومع ذلك، فإن تخزين السائل المنوي بالتبريد أو بالتجميد يُنتج بعض الأضرار الفيزيائية والبيوكيميائية في الغشاء البلازمي للحيوان المنوي في العديد من أنواع الحيوانات، مما يؤدي إلى إنخفاض في حركة الحيوان المنوي ومعدل بقاؤه حياً، وتضرر الغشاء البلازمي، وسلامة الحامض النووي وضرر الأكروسوم، مما يؤدي إلى تقليل القدرة على الإخصاب (Bozkurt, *et. al.*, 2007; Aksoy *et. al.*, 2010; El-Nattat *et. al.*, 2011; Rosato and Iaffaldano 2011). بالإضافة إلى ذلك، تسبب معاملة الحيوانات المنوية للتذبذبات أثناء الحفظ إلى زيادة في نسبة الشوارد الحرة المتضمنة للأكسجين والتي تؤدي إلى تأثير ضار على حركة الحيوان المنوي، وقدرته على البقاء، وسلامة الأكروسوم وقدرته على الإخصاب، وذلك بسبب التغيرات التي تحدث في الغشاء البلازمي للحيوانات المنوية (Ball *et. al.*, 2001; Aitken and Baker 2004). وكذلك تؤثر الشوارد الحرة المتضمنة للأكسجين على سلامة الحمض النووي (Çoyan *et. al.*, 2012). وللتغلب على هذه المشاكل، تمت إضافة بعض المواد المختلفة إلى السائل المنوي المخفف بواسطة مخففات مختلفة خلال الحفظ بالتبريد.

الزيولايت عبارة عن سيليكات الألمنيوم، والصوديوم والكالسيوم بصفة أساسية، ويحتوي على نسبة كبيرة من الماء (حلمي 1961). يتألف الزيولايت من مجموعة كبيرة من المعادن المتبلورة، حيث يتكون من سيليكات الألمنيوم والعناصر القلوية وترتبط السيليكا والألمنيوم والأكسجين معاً لتشكيل وحدة التتراهيدرات، والتي تشكل الوحدة الأساسية في بناء معدن الزيولايت وهو ما يسمى بالتركيب البنائي المفتوح (Tsitsishvili *et. al.*, 1992). ولكن هذه الوحدة الأساسية غير متعادلة كهربيا وذلك نتيجة إحلال الألمونيوم الثلاثي التكافؤ محل السيليكا رباعية التكافؤ، مما يكون شحنة زائدة غير متعادلة. ويتم تعادل هذه الشحنة الزائدة بإضافة عنصر أخر أحادي أو ثنائي التكافؤ مثل الصوديوم، أو البوتاسيوم، أو الكالسيوم..الخ، وبذلك يكون التركيب العام للزيولايت هو: $(M_2M)\ Al_2O_3\ SiO.H_2O$، حيث M_2 هي الصوديوم أو البوتاسيوم و M هي الماغنسيوم أو الكالسيوم. التركيب البنائي المفتوح للزيولايت يعطيه خواص مميزة وفريدة بين المعادن، مما يؤدي الى أهميته وتطبيقاته المتعددة في كثير من الصناعات (الخوالدة،1996)، فبناؤه البلوري المكون من سلاسل حلقية من التتراهيدرات متصلة مع بعضها البعض عن طريق الكاتيونات مثل الصوديوم والبوتاسيوم ..الخ. يؤدي الى ما يسمى بالبناء المفتوح وقد سمي بذلك لكثرة القنوات والفجوات في تركيبة والتي قد تشكل 50 % من حجم بعض أنواع الزيولايت. ومن أهم خواصه الناتجة عن هذا التركيب خاصية تصفية الجزيئات، الاستبدال الأيوني، فقدان وامتصاص الماء، خواص مساعدة أو محفزة، خاصية امتصاص الغازات و الأبخرة و أخيراً يتميز بكثافة منخفضة و ثبات البنية البلورية عند نزع الماء.

لا توجد دراسات متاحة على تأثير الزيولايت فى مخففات السائل المنوى على خصائص الحيوانات المنوية. لذلك كان الهدف من هذه الدراسة هو تقييم إضافة معدن الزيولايت بنسبة 1% إلى مخفف السائل المنوي للأرانب من خلال دراسة خصائص الحيوانات المنوية بعد فترة الإتزان وبعد التجميد والإسالة، كذلك دراسة الموت المبرمج والتركيب الدقيق للحيوانات المنوية و قياس بعض الدلالات البيوكيميائية في المخفف بعد التجميد والإسالة.

* **Corresponding author.**
E-mail address: w-khalil@mans.edu.eg
DOI: 10.21608/jappmu.2019.63457

الطريقة البحثية

المواد والطرق

أجريت هذه الدراسة في معمل الفسيولوجي والتكنولوجيا الحيوية بقسم إنتاج الحيوان - كلية الزراعة - جامعة المنصورة - مصر خلال الفترة من مايو وحتى أكتوبر 2019.

الحيوانات التجريبية:

إستخدمت في هذه الدراسة 10 أرانب ذكور من سلاله النيوزيلندي الأبيض وتراوحت أعمارها بين ٤ الى ٥ شهور وبمتوسط وزن الجسم الحي (1,750 ± 0,25كجم) وكانت حالتها الصحية جيدة وخالية من الامراض. تم وضع كل أرنب بشكل منفرد في أقفاص مصنوعة من الأسلاك المجلفنة ذات أبعاد (40×30×25 سم). وكانت الأعلاف والمياه متوفرة على مدار الوقت وقدمت لها عليقة غذائية تجارية تبعاً للإحتياجات الغذائية المقررة من (NRC, 1977)، مع توفير ظروف بيئية جيدة لتربية الارانب.

جمع السائل المنوي:

تم جمع السائل المنوي من الأرانب مرتين اسبوعيا باستخدام المهبل الصناعي وكان يتم تقييم السائل المنوي بعد القذف مباشرة واستخدام القذفات التي تتوافر فيها الخصائص التالية: حجم القذفة المنوية أكبر من أو يساوى 0.2 مل ، عدد الحيوانات المنوية لكل مل أكبر من أو يساوى 100 مليون، حركة جماعية، نسبة الحيوانات المنوية الحية وسلامة الغشاء أكبر من أو يساوى 70%، ونسبة الحيوانات المنوية الشاذة أقل من أو يساوى 15%.

تخفيف وحفظ السائل المنوي:

بعد إجراء الفحص المجهري وتقييم السائل المنوي الطازج تم تخفيفه بواسطة سائل التخفيف تريس- صفار البيض ويوضح جدول رقم (1) تركيب المخفف. كان يتم التخفيف بنسبة 1 سائل منوي: 4 مخفف. تم وضع السائل المنوي المخفف في الثلاجة على درجة حرارة (5° م) لمدة ساعتين كفترة إتزان، وبعد ذلك تم تعبئة السائل المنوي المخفف في قشات ربع ملى وتم تعريضها لبخار النتروجين السائل على ارتفاع 4 سم من سطح النتروجين السائل لمدة 10 دقائق. ثم بعد ذلك تم غمسها في النتروجين السائل على درجة (-196 درجه مئوية) وذلك لحفظ السائل المنوي المخفف مجمداً. بعد ذلك تمت الاسالة حيث وضعت القشات في حمام مائي على درجة حرارة 35 درجة مئوية لمدة 30 ثانية.

جدول 1. تركيب سائل التخفيف:

التركيب	جم/ 100 مل من الماء المقطر
محلول منظم	
تريس	3.028
حامض الستريك	1.681
جلوكوز	1.243
الستربتومايسين	0.01
بنسلين	0.01
ماء مقطر	100
سائل التخفيف	
المحلول المنظم (مل)	76.0
داى ميثيل سلفاوكسيد (مل)	4.0
صفار البيض (مل)	20.0

التصميم التجريبي:

تم إضافة الزيولايت بتركيز1٪ إلى سائل التخفيف وتم مقارنته بسائل التخفيف دون أي إضافات، وتم دراسة خصائص الحيوانات المنوية بعد فترة الإتزان وبعد التجميد والإسالة، كذلك دراسة الموت المبرمج والتركيب الدقيق للحيوانات المنوية و قياس بعض الدلالات البيوكيميائية في المخفف بعد التجميد والإسالة.

تقييم السائل المنوي:

بعد عملية الجمع:

حجم السائل المنوي (مل): تم تقدير حجم السائل المنوي بعد الجمع مباشرةً بعد ازالة المادة الجيلاتينية المصاحبة للسائل المنوي المجمع.

تركيز الحيوانات المنوية (مليون/مل): تم قياس تركيز الحيوانات المنوية عن طريق العد المباشر للحيوانات المنوية بإستخدام شريحة الهيموستيوميتر لعد كرات الدم حيث خفف السائل المنوي 200 مرة باستخدام محلول ملحي 3% (Zeidan *et. al.*, 2002).

تقدير النسبة المئوية للحركة الجماعية (%): قدرت الحركة الجماعية عن طريق أخذ قطرة من السائل المنوي المجمع ووضعها على شريحة زجاجية دافئة وفحصها تحت المجهر ذو الأطوار المتباينة (لايكا DM 500) بقوة تكبير 100 مرة كما بينت بواسطة (Zeidan *et. al.*, 2002).

بعد فترة الإتزان وبعد التجميد والأسالة:

النسبة المئوية للحركة التقدمية (%): وقدرت النسبة المئوية حسب (Salisbury and Floyd 1978)، حيث وضعت قطرة من السائل المنوي المخفف (10 ميكروليتر) على شريحة دافئة مع وضع غطاء شرائح عليها وفحصها تحت المجهر ذو الأطوار المتباينة بقوة تكبير 100 مرة وتم تقدير نسبة الحيوانات المنوية ذات الحركة التقدمية.

النسبة المئوية للحيوانات المنوية الحية (%): مباشرةً تم أخذ قطرة من السائل المنوي ووضعها على شريحة زجاجية وتم صبغها بصبغة الايوسين 5٪ وصبغة النيجروسين 10٪ ثم خلطها وسحبها على الشريحة بالكامل، وفقاً لطريقة (Moskovtsev and Librach, 2013) وتم فحصها تحت الميكروسكوب الضوئي (لايكا DM 500) بقوة تكبير 400 مرة لتقدير النسبة المئوية للحيوانات المنوية الحية ذات لون الرأس الأبيض بينما الحيوانات المنوية الميتة تأخذ رأسها اللون الأحمر وكان يتم العد في 200 حيوان منوي في مناطق مختلفة من الشريحة الزجاجية (صورة رقم 1).

النسبة المئوية للحيوانات المنوية الشاذة (%): تم تقدير نسبة الحيوانات المنوية الشاذة على نفس فيلم الأيوسين والنيجروسين حيث قدرت نسبة الحيوانات المنوية الشاذة (تشوهات في الرأس والذيل) كما هو موضح وفقًا لطريقة (Hill and Menon 2011) تحت الميكروسكوب الضوئي (لايكا DM 500) بقوة تكبير 400 مرة، وكان يتم العد في 200 حيوان منوي في مناطق مختلفة من الشريحة الزجاجية.

إختبار سلامة الغشاء البلازمى (إختبار إنخفاض الإسموزية): تم تعريض الحيوانات المنوية لمحلول منخفض الإسموزية لتقييم سلامة الغشاء البلازمي للحيوانات المنوية كما هو موضح في (Caycho 2016). بإختصار تم وضع 50 ميكروليتر من السائل المنوي المخفف مع محلول منخفض الاسموزية 500 ميكروليتر (6.75 جم / لتر من الفركتوز و 3.67 جم / لتر من سترات الصوديوم، لإعطاء مستوى إسموزية 75 ملي إزمول /كجم) في حمام مائي على درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة، بعد ذلك تم وضع10 ميكرولتر من الخليط على شريحة زجاجية مع وضع غطاء شرائح عليها وفحصها تحت المجهر ذو الأطوار المتباينة (لايكا DM 500) بقوة تكبير 400 مرة، وكان يتم عد 200 حيوان منوي وتحسب الحيوانات المنوية المستجيبة للمحلول الاسموزي (ذات الغشاء البلازمي السليم) وذلك من خلال إلتواء ذيل الحيوان المنوي (صورة رقم 2).

بعد التجميد والإسالة:

تحليل الموت المبرمج للخلايا بإستخدام الفلوسيتوميترى:تم صبغ عينات السائل المنوي المخفف بـ Annexin V كما هو موضح بواسطة (Chaveiro *et. al.*, 2007)، مع بعض التعديلات. حيث يتم أخذ عينة من معلق السائل المنوي المخفف بحجم 1مل وتوضع في أنبوب 5 مل مع محلول إرتباط 2 مل وذلك للخلط الجيد. تم نقل 100 ميكروليتر من معلق الحيوانات المنوية إلى أنبوب إختبار أخر وتم إضافة 5 ميكروليتر من صبغة Annexin V (FITC) و 5 ميكروليتر من Propidium Iodide (PI) وبعد ذلك يتم تحضينها في الظلام على درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة على الأقل. بعد انتهاء وقت التحضين يتم وضع 200 ميكرولتر من محلول الإرتباط المستعمل على معلق الحيوانات المنوية، حتى تكون الحيوانات المنوية جاهزة لتحليل الموت المبرمج للخلايا بإستخدام الفلوسيتوميتري. أجري التحليل بواسطة جهاز Accuri C6 Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) وبإستخدام برنامج Accuri C6 software (Becton Dickinson) لتقييم النتائج طبقا لكل من (Masters and Harrison 2014). تم عد الحيوانات المنوية بإستخدام مقياس التدفق الخلوي BD Accuri TM C6 النسب المئوية لـ Annexin V سالبة أو موجبة (-A أو+ A)، و PI سالبة أو موجبة (-PI أو+ PI)، وبناء على ذلك تم تقسيم الحيوانات المنوية إلى أربع فئات كما وصفها(Peña *et. al.*, 2003).

أ- قادرة على البقاء (-A / -PI)، غير متوهجة وتم تسجيلها على أنها حية بدون وجود خلل في الغشاء البلازمي (الحيوانات المنوية الحية).

ب- بداية علامات الموت المبرمج (-PI / + A) ، يتم تصنيفها أيضاً على أنها قابلة للحياة حيث تصبغ فقط بـ Annexin-V.

ج- الحيوانات المنوية ذات الموت المبرمج (+PI / +A) التي تصبغ بكل من Annexin V و PI مع وجود تلف في أغشيتها.

د- الحيوانات المنوية ذات التنخر (+PI / -A)، وفي هذه المرحلة تفقد الحيوانات المنوية الغشاء البلازمي بالكامل (حيوانات منوية ميتة).

فحص التغير في التركيب الدقيق بواسطة المجهر الإلكتروني النافذ: تمت معاملة عينات السائل المنوي المخفف للفحص بإستخدام الميكرسكوب الإليكتروني النافذ كما وضحها (Oliveira *et. al.*, 2011)، مع إجراء بعض التعديلات. بإختصار، تم عمل طرد مركزي لـ500 ميكرولتر من السائل المنوي المخفف وتعليقه في محلول مثبت يتألف من 2.5٪ من الجلوتارالدهايد في محلول الفوسفات المنظم لمدة 2 ساعة على 4 درجة مئوية. بعد ذلك، تم غسل العينات وتثبيتها في 1 ٪ من رباعي أكسيد الأوزيميوم لمدة 90 دقيقة في درجة حرارة الغرفة. ثم تم نزع الماء من العينات المثبتة بإستخدام محلول الإيثانول بشكل تدريجي وتم معاملتها مع أكسيد البروبيلين وتم خلطها مع مادة الراتنج (Epon 812; Fluka Chemie, Switzerland) تم عمل قطاعات بسمك (60 -70 نانومتر). ولقد تم استخدام جهاز JEOL-JEM 2100 TEM بقدرة 80 كيلو فولت لإجراء فحص التراكيب الاساسية للحيوانات المنوية في 100 حيوان منوي لكل معاملة. لوحظت ثلاثة أنماط مختلفة وتم تعريفها وفقا للمعايير الموصوفة سابقا(Baccetti *et al.*, 1996) كما يلي:

أ- الحيوانات المنوية السليمة: تكون الحيوانات المنوية خالية من العيوب في التركيب الدقيق، ويكون التركيب الدقيق لمكونات الحيوان المنوي (النواة ، الغشاء البلازمي ، السيتوتوبلازم ، الاكروسوم) طبيعي وسليم.

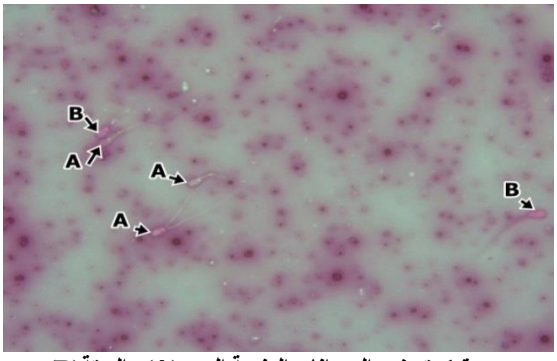
ب- الحيوانات المنوية ذات الموت المبرمج: تميزت النواه بتغير في الكروماتين، شكل غير منتظم، نواة مزدوجة أو أنوية عديدة. ويمكن ملاحظة بقايا سيتوبلازمية، الغشاء البلازمي سليم أو أكروسوم مشوه.

ج- الحيوانات المنوية ذات التنخر: نواة مشوه مع تنخر الكروماتين التي قد تكون جزءً لا يتجزأ في بقايا السيتوبلازم. الغشاء البلازمي غير سليم، الأكروسوم غائب أو مشوه.

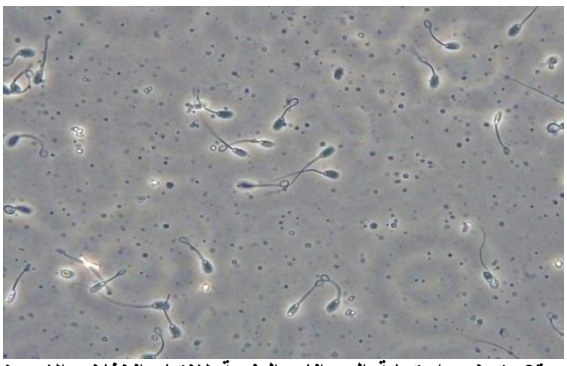
تحليل بعض دلالات الإجهاد التأكسدي في مخفف السائل المنوي بعد التجميد والإسالة: أجريت عملية الطرد المركزي لعينات السائل المنوي بعد التجميد والإسالة لمدة 15 دقيقة عند 1500 لفة في الدقيقة، ثم تم فصل البلازما المنوية وتخزينها في درجة حرارة -20 درجة مئوية. تم قياس تركيز مضادات الأكسدة الكلية وكذلك المالون داى ألدهيد و فوق أكسيد الهيدروجين بواسطة كواشف تجارية من شركة بيوديجنوستيك - مصر بإستخدام مقياس الطيف الضوئي (Spectro UV-VIS Auto, UV-2602, Labomed, USA).

التحليل الاحصائي:

تم أجراء تحليل التباين (ANOVA) من خلال تصميم أحادي الاتجاه، باستخدام (GLM) بإستخدام برنامج SAS(SAS, 2007) تم قياس الاختلافات بين المعاملات من خلال إختبار دنكن متعدد المدى (Duncan 1955)، وتعيين نسبة الاختلاف عند مستوى معنوية P<0.05.



صورة 1. توضح الحيوانات المنوية الحي (A) والميتة(B)



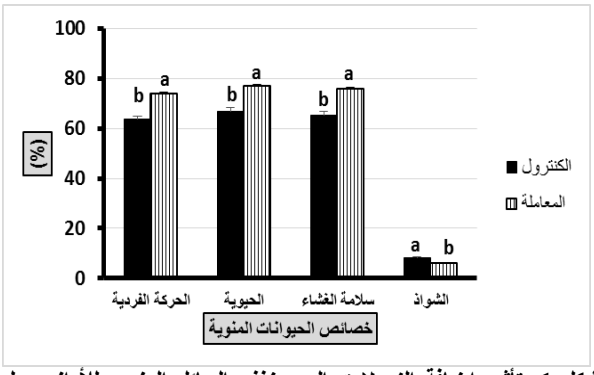
صورة2. توضح إستجابة الحيوانات المنوية لإختبار إنخفاض الإسموزية (سلامة الغشاء)

النتائج والمناقشات

النتائج

خصائص الحيوانات المنوية بعد فترة الإتزان:

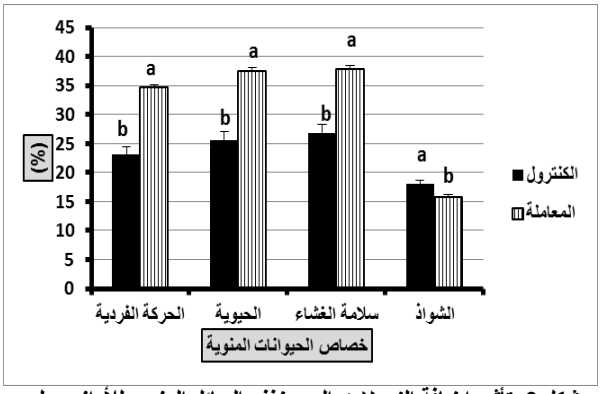
يوضح الشكل رقم (1) تأثير إضافة الزيولايت إلى مخفف السائل المنوي للأرانب على خصائص الحيوانات المنوية بعد فترة الإتزان. وتشير النتائج إلى أن المعاملة بالزيولايت أدت إلى تحسن معنوي (P<0.05) في نسب كل من الحركة الفردية، الحيوية وسلامة الغشاء، بينما قلت معنوياً (P<0.05) نسبة الشواذ نتيجة المعاملة.



شكل 1. تأثير إضافة الزيولايت إلى مخفف السائل المنوي للأرانب على خصائص الحيوانات المنوية بعد فترة الإتزان.

خصائص الحيوانات المنوية بعد التجميد والإسالة:

يوضح الشكل رقم (2) تأثير إضافة الزيولايت إلى مخفف السائل المنوي للأرانب على خصائص الحيوانات المنوية بعد التجميد والإسالة. وتشير النتائج إلى أن المعاملة بالزيولايت أدت إلى تحسن معنوي (P<0.05) في نسب كل من الحركة الفردية، الحيوية وسلامة الغشاء، بينما قلت معنوياً (P<0.05) نسبة الشواذ نتيجة المعاملة.



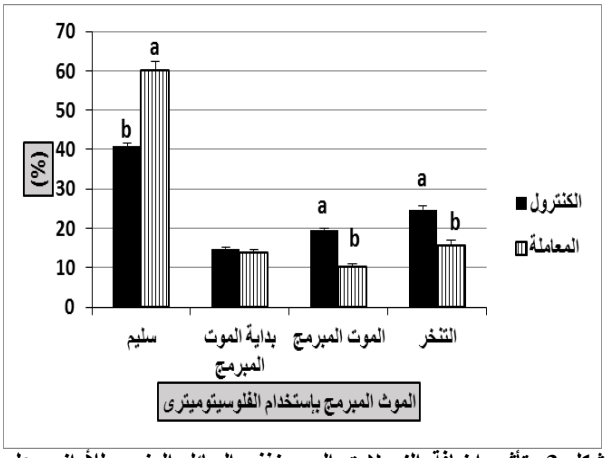
شكل 2. تأثير إضافة الزيولايت إلى مخفف السائل المنوي للأرانب على خصائص الحيوانات المنوية بعد التجميد والإسالة.

الموت المبرمج لخلايا الحيوانات المنوية بإستخدام الفلوسيتوميتري بعد التجميد والإسالة:

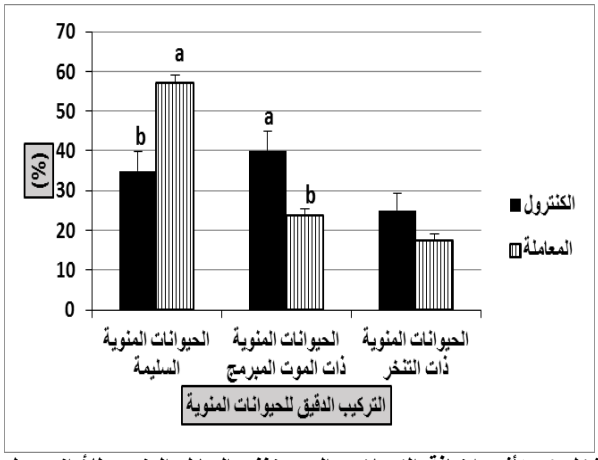
يوضح الشكل رقم (3) تأثير إضافة الزيولايت إلى مخفف السائل المنوي للأرانب على الموت المبرمج لخلايا الحيوانات المنوية بإستخدام الفلوسيتوميتري بعد التجميد والإسالة. وتشير النتائج إلى أن المعاملة بالزيولايت أدت إلى تحسن معنوي (P<0.05) في نسب الحيوانات المنوية السليمة، بينما قللت المعاملة معنوياً (P<0.05) نسب كل من الحيوانات المنوية ذات الموت المبرمج والحيوانات المنوية ذات التنخر. بينما لم يكن هناك تأثير معنوي للمعاملة على نسبة الحيوانات المنوية في بداية الموت المبرمج.

التركيب الدقيق للحيوانات المنوية بعد التجميد والإسالة:

يوضح الشكل رقم (4) تأثير إضافة الزيولايت إلى مخفف السائل المنوي للأرانب على التركيب الدقيق للحيوانات المنوية بعد التجميد والإسالة بإستخدام المجهر الإليكتروني. وتشير النتائج إلى أن المعاملة بالزيولايت أدت إلى تحسن معنوي (P<0.05) في نسب الحيوانات المنوية السليمة، بينما قللت المعاملة معنوياً (P<0.05) نسبة الحيوانات المنوية ذات الموت المبرمج. بينما لم يكن هناك تأثير معنوي للمعاملة على نسبة الحيوانات المنوية ذات التنخر ولكنها كانت أقل في المعاملة عن الكنترول.



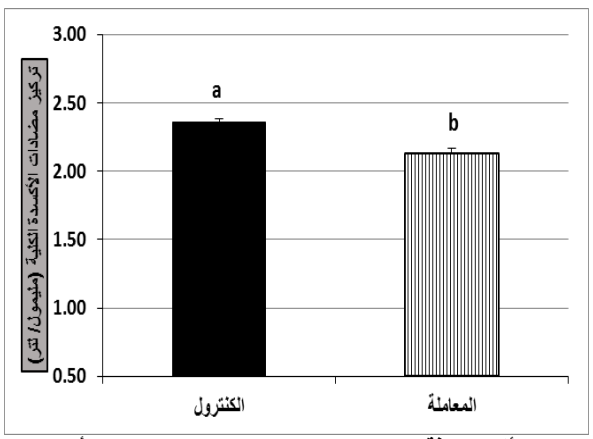
شكل 3. تأثير إضافة الزيولايت إلى مخفف السائل المنوي للأرانب على الموت المبرمج لخلايا الحيوانات المنوية بعد التجميد والإسالة بإستخدام الفلوسيتوميترى.



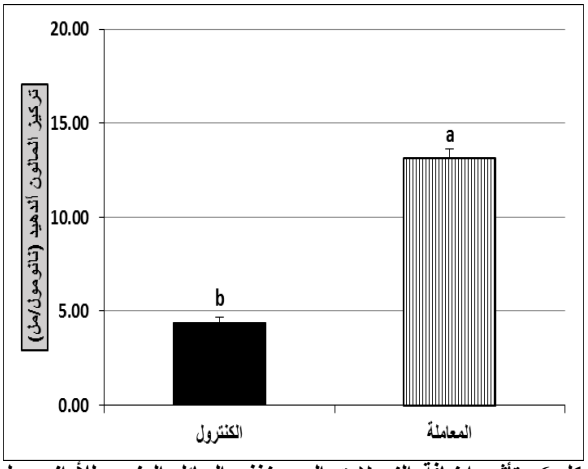
شكل 4. تأثير إضافة الزيولايت إلى مخفف السائل المنوي للأرانب على التركيب الدقيق للحيوانات المنوية بعد التجميد والإسالة بإستخدام المجهر الإليكتروني النافذ.

دلالات الإجهاد التأكسدي في المخفف بعد التجميد والإسالة:

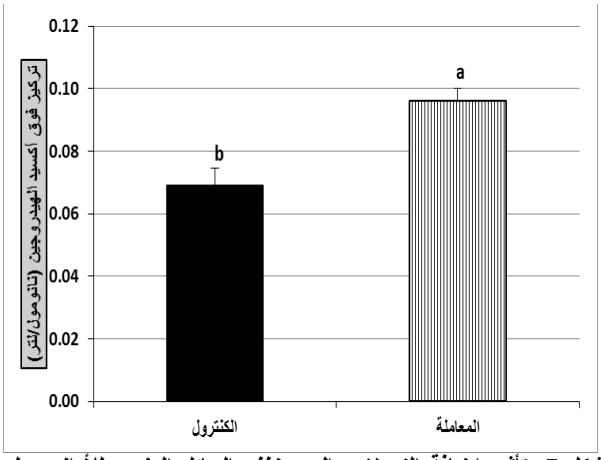
توضح الأشكال رقم (5- 7) تأثير إضافة الزيولايت إلى مخفف السائل المنوي للأرانب على بعض دلالات الإجهاد التأكسدي (مضادات الأكسدة الكلية، المالون داى الدهيد وفوق أكسيد الهيدروجين على التوالي) في مخفف السائل المنوي بعد التجميد والإسالة. على عكس النتائج السابقة تشير هذه النتائج إلى أن مضادات الأكسدة الكلية كانت أقل معنوياً ($P<0.05$) في المعاملة بالزيولايت عن الكنترول، بينما زادت دلالات الإجهاد التأكسدي معنوياً ($P<0.05$) المالون داى ألدهيد وفوق أكسيد الهيدروجين نتيجة المعاملة بالزيولايت مقارنة بالكنترول.



شكل 5. تأثير إضافة الزيولايت إلى مخفف السائل المنوي للأرانب على تركيز مضادات الأكسدة الكلية في المخفف بعد التجميد والإسالة.



شكل 6. تأثير إضافة الزيولايت إلى مخفف السائل المنوي للأرانب على تركيز المالون داى ألدهيد في المخفف بعد التجميد والإسالة.



شكل 7. تأثير إضافة الزيولايت إلى مخفف السائل المنوي للأرانب على تركيز فوق أكسيد الهيدروجين في المخفف بعد التجميد والإسالة.

المناقشة

تطورت تقنيات التناسل المساعدة في الثدييات على مدى السنوات الطويلة وذلك للحفاظ على السلالات التي توشك على الإنقراض والمحافظة عليها. إضافة إلى ذلك، تساهم هذه التقنيات في نقل الصفات الوراثية الجيدة إلى كافة أنحاء العالم بكل سهولة بدلاً من نقل الحيوانات الحية. ومن الخيارات الممكنة حفظ الحيوانات المنوية بالتجميد حيث أنها ذات تكلفة اقتصادية قليلة وقادرة على حفظ التراكيب الوراثية ونقل الحيوانات المنوية إلى مناطق بعيدة. ومع ذلك, توجد بعض المشاكل عند إسالة السائل المنوي بعد عملية التجميد مثل (إنخفاض نسبة الخصوبة وموت الحيوانات المنوية). إن التلقيح الصناعي بإستخدام السائل المنوي المجمد في الأرانب لم يستخدم للأغراض التجارية في الوقت الحاضر (López and Alvariño 1998 Mocé and Vicente 2009;) حيث تؤدى البلورات الثلجية في السائل الخلوي للحيوان المنوي في الثدييات عند الإسالة بعد عملية التجميد إلى ضرر في الغشاء البلازمي وموت الحيوانات المنوية (Fuller and Paynter 2004, Hernández *et. al.,* 2012). لتجنب والحد من حدوث هذه الأضرار فإنه من الضروري تحسين نظم حفظ السائل المنوي بالتجميد في الأرانب.

تعتبر هذه الدراسة الأولى لتقييم أثر التركيب الفريد لمعدن الزيولايت على حفظ السائل المنوي للأرانب، وأشارت النتائج إلى أن إضافة الزيولايت إلى مخفف السائل المنوي للأرانب أدى إلى تأثيرات إيجابية على الحيوانات المنوية بعد التجميد والإسالة حيث حسن من صفات الحيوانات المنوية وقلل من الموت المبرمج وأدى للحد من الضرر في التركيب الدقيق للحيوانات المنوية في الأرانب بعد التجميد والإسالة.

الزيولايت عبارة عن بلورات سيليكات الألمنيوم، والصوديوم والكالسيوم منخفضة الكثافة تمتلك مسام منتظمة (أحادية، ثنائية وثلاثية الأبعاد) ذات أحجام وأشكال مسام محددة بشكل جيد.

يوجد للزيوليت نشاط كبير في مضادات الأكسدة، والتي يمكن أن تكون مفيدة في الطب البشري والبيطري. وأظهرت الدراسات أن

Ball, B.;Medina, V.;Gravance, C. and Baumber, J. (2001). Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 C, *Theriogenology* 56, 577-589.

Bozkurt, T.; Türk, G. and Gür, S. (2007). The time-dependent motility and longevity of stallion spermatozoa diluted to different spermatozoal concentrations and extenders during cool-storage. *Revue Méd. Vét.*, 158, 67-72

Caycho, T. (2016). Necrología. Ernesto Pollitt Burga (1938-2016), *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento* 8, 3-6.

Chaveiro, A.;Santos, P. and Da Silva, F. (2007). Assessment of sperm apoptosis in cryopreserved bull semen after swim-up treatment: a flow cytometric study, *Reproduction in domestic animals* 42, 17-21.

Çoyan, K.;Bucak, M.N.;Başpınar, N.;Taşpınar, M. and Aydos, S. (2012). Ergothioneine attenuates the DNA damage of post-thawed Merino ram sperm, *Small ruminant research* 106, 165-167.

Dogliotti, G.;Malavazos, A.E.;Giacometti, S.;Solimene, U.;Fanelli, M.;Corsi, M.M. and Dozio, E. (2011). Natural zeolites chabazite/phillipsite/analcime increase blood levels of antioxidant enzymes, *Journal of clinical biochemistry and nutrition*,1-4.

Duncan, D.B. (1955). Multiple range and multiple F tests, *Biometrics* 11, 1-42.

El-Nattat, W.;El-Sheshtawy, R. and Mohamed, A. (2011). Effect of L-Carnitine on semen characteristics of chilled rabbit semen, *GJBB* 6, 8-12.

Fuller, B. and Paynter, S. (2004). Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine, *Reproductive biomedicine online* 9, 680-691.

Hernández, P.;Fernández, R.;Rodríguez, S.;Negrete, R.;Soto, M. and García, R. (2012). Effect of cryopreservation on viability and the acrosomal state of New Zealand rabbit (Oryctolagus cuniculus) semen, *Revista de Salud Animal* 34, 188-191.

Hill, H. and Menon, J. (2011). Reducing vulnerability in transition economies: crises and adjustment in Cambodia, *ASEAN Economic Bulletin*134-159.

Khlifaoui, M.;Battut, I.;Bruyas, J.F.;Chatagnon, G.;Trimeche, A. and 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.

López, F. and Alvariño, J. (1998). Artificial insemination of rabbits with diluted semen stored up to 96 hours, *World Rabbit Science* 6.

López-Gatius, F.;Sances, G.;Sancho, M.;Yániz, J.;Santolaria, P.;Gutiérrez, R.;Núñez, M.;Núñez, J. and Soler, C. (2005). Effect of solid storage at 15 C on the subsequent motility and fertility of rabbit semen, *Theriogenology* 64, 252-260.

Masters, A. and Harrison, P. (2014). Platelet counting with the BD AccuriTM C6 flow cytometer, *Platelets* 25, 175-180.

Mocé, E. and Vicente, J.S. (2009). Rabbit sperm cryopreservation: a review, *Animal reproduction science* 110, 1-24.

للكلينوبتيوليت (السيليكا والألومينا رباعي الاسطح) أثار إيجابية على خلايا الكبد بعد أستئصال الكبد الجزئي في الفئران على أساس الأثار المضادة للأكسدة من هذا الزيوليت. بعد تجريعه عن طريق الفم، أدى كلينوبتيوليت إلى إنخفاض مستوى المالون داى ألدهيد والذي يدل على الإجهاد التأكسدي في أنسجة الكبد. وفي نفس الوقت، أزداد نشاط أكسدة انزيم ديسموتاز ومستوى الجلوتاثيون، مما يؤدي إلى إرتفاع مستوى مضادات الأكسدة بصورة كبيرة في هذا النسيج (Saribeyoglu *et. al.*, 2011).

للزيوليت أيضًا تأثير وقائي على خلايا الكبد أثناء معالجتها بمضادات السرطان باستخدام Adriamycin أدرياميسين (دوكسوروبيسين). بعض الدراسات الاولية تشير الى أن خلايا الكبد المأخوذة من الفئران التي عولجت بأدوية أدرياميسين Adriamycin، فإن المعاملة لاحقاً باستخدام كلينوبيلوليت قللت بشكل كبير من إنتاج inflammatory cytokines السيتوكينات الإلتهابية، على سبيل المثال عامل نخر الورم - ألفا (TNF-α)، إنترلوكين (IL-1β) المفرزة بواسطة خلايا الكبد. بالإضافة إلى ذلك، أدى هذا العلاج إلى انخفاض موت الخلايا المبرمج للخلايا الكبدية. وعزت هذه النتائج إلى تأثير العوامل المضادة للأكسدة من كلينوبتيوليت (Yapislar *et. al.*, 2016).

كذلك قلل كلينوبتيوليت من أكسدة الدهون وعزز من تأثير دوكسوروبيسين في الحيوانات المصابة بالأورام (الفئران والكلاب) التي عوملت بـ doxorubicine (Zarcovic *et. al.*, 2003).

كما أن تجريع الزيوليت الخام عن طريق الفم مثل إستخدام الأنواع الطبية لمعدن الزيوليت مثل الكابازيت – الفليبسيت والانالسيم والتي تعمل على زيادة مستويات إلانزيمات المضادات للاكسدة في الدم، وهي الجلوتاثيون بيروكسيديز، السوبر أكسيد ديزميتاز والجلوتاثيون، وخفض أكسدة الدهون في الرجال المدخنين وغير المدخنين (Dogliotti *et. al.*, 2011).

عندما يتحد الزيوليت الخام من نوعي الفوجاسيت والفيرريت يؤدي ذلك الى إنخفاض الشوارد الحرة المتضمنة للأكسجين في أليبومين الأنسان تحت الظروف المعملية. ويعزى ذلك إلى تحويل تلك الشوارد الحرة المتضمنة للأكسجين إلى جزيئات الماء داخل الفراغات الموجودة في البيئة الداخلية للزيوليت (Pellegrino *et. al.*, 2011).

يمكن أيضًا إستخدام الخصائص المضادة للأكسدة للزيوليت في علاج مرض الزهايمر (Montinaro *et. al.*, 2013) ويمكن للزيوليت أيضاً أن يحمي الجلد من التلف الناتج عن الأشعة فوق البنفسجية (Shen *et. al.*, 2006).

كما تم ذكره أعلاه ، يمكن أيضًا إستخدام الزيولايت ذو الخصائص مضادة للأكسدة في الطب البيطري، وعلى سبيل المثال تحسين قدرة مضادات الأكسدة لدجاج التسمين، والذي يؤدي إلى زيادة إنزيمات الجلوتاثيون بيروكسيديز، الكاتلاز وديسموتاز، وإنخفاض في المالون داى ألدهيد (Wu *et al.*, 2013)

الخلاصة: إضافة الزيولايت الى مخفف السائل المنوي أدى إلى تحسين خصائص الحيوانات المنوية للأرانب بعد التجميد والإسالة، عن طريق الحد من نسبة الموت المبرمج وكذلك تلف التركيب الدقيق للحيوانات المنوية والذي يحدث أثناء حفظها بالتجميد.

المراجع

الخوالدة، طه، 1996، الزيولايت، مجلة التعدين العربية، مجلد 13، العدد 1- عمان– الأردن، ص19-14.

حلمي، محمد عز الدين1961م، كتاب علم المعادن، جامعة عين شمس– مصر.

Aitken, R.J. and Baker, M.A. (2004). Oxidative stress and male reproductive biology, *Reproduction, Fertility and development* 16, 581-588.

Aksoy, M.;Cankat Lehimcioglu, N. and Akman, O. (2010). Effect of seminal plasma on functional integrity of rabbit sperm membranes during storage at 4ºC or freezing, *World Rabbit Science* 16.

Baccetti, B.; Collodel, G.and Piomboni P. (1996). Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J. Submicr. Cytol. Pathol.* 28,587-596.

Saribeyoglu, K.;Aytac, E.;Pekmezci, S.;Saygili, S.;Uzun, H.;Ozbay, G.;Aydin, S. and Seymen, H.O. (2011). Effects of clinoptilolite treatment on oxidative stress after partial hepatectomy in rats, *Asian journal of surgery* 34, 153-157.

Sarıözkan, S.;Cantürk, F.;Yay, A. and Akçay, A. (2012). The effect of different storage temperature on sperm parameters and DNA damage in liquid stored New Zealand rabbit spermatozoa, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 18, 475-480.

SAS (2007). Statistical analysis System. Stat-user's guid. Release 9.1.3.

Shen, B.;Scaiano, J. and English, A.M. (2006). Zeolite encapsulation decreases TiO2-photosensitized ROS generation in cultured human skin fibroblasts, *Photochemistry and photobiology* 82, 5-12.

Tsitsishvili, G. V., Andronikashvili, T. G., Kirov, G. N. and Filizova, L. D. (1992). Natural zeolites, Ellis Horwood Ltd, New York, pp. 295.

Wu, Y.;Wu, Q.;Zhou, Y.;Ahmad, H. and Wang, T. (2013). Effects of clinoptilolite on growth performance and antioxidant status in broilers, *Biological trace element research* 155, 228-235.

Yapislar, H.;Taskin, E.;Ozdas, S.;Akin, D. and Sonmez, E. (2016). Counteraction of apoptotic and inflammatory effects of adriamycin in the liver cell culture by clinopitolite, *Biological trace element research* 170, 373-381.

Zarcovic, N.;Zarcovic, K.;Kralj, M.;Borovic, S.;Sabolovic, S.;Blazi, M.P.;Cipak, A. and Pavelic, K. (2003). Anticancer and antioxidative effects of micronized zeolite clinoptilolite, *Anticancer research* 23, 1589-1596.

Zeidan, A.;Abulnaga, A.;Ibrahim, Z. and Hamedi, M. (2002). Quality, enzymatic activity and fertility rate of the cooled rabbit semen supplemented with caffeine, *Egyptian J Rabbit Sci* 12, 27-41.

Montinaro, M.;Uberti, D.;Maccarinelli, G.;Bonini, S.A.;Ferrari-Toninelli, G. and Memo, M. (2013). Dietary zeolite supplementation reduces oxidative damage and plaque generation in the brain of an Alzheimer's disease mouse model, *Life sciences* 92, 903-910.

Moskovtsev, S. I. and Librach, C. L. (2013). Methods of sperm vitality assessment. *Methods In Molecular Biology*, 927: 13-19.

Oliveira, L.Z.;Hossepian de Lima, V.F.;Levenhagen, M.A.;Dos Santos, R.M.;Assumpção, T.I.;Jacomini, J.O.;de Andrade, A.F.;de Arruda, R.P. and Beletti, M.E. (2011). Transmission electron microscopy for characterization of acrosomal damage after Percoll gradient centrifugation of cryopreserved bovine spermatozoa, *Journal of veterinary science* 12, 267-272.

Pellegrino, P.;Mallet, B.;Delliaux, S.;Jammes, Y.;Guieu, R. and Schäf, O. (2011). Zeolites are effective ROS-scavengers in vitro, *Biochemical and biophysical research communications* 410, 478-483.

Peña, A.O.;Gómez, J.P.R. and Rubio, A.M. (2003). Potenciar la capacidad de aprender a aprender. Alfaomega.

Roca, J.;Martınez, S.;Vazquez, J.;Lucas, X.;Parrilla, I. and Martınez, E. (2000). Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15 C, *Animal reproduction science* 64, 103-112.

Rosato, M. and Iaffaldano, N. (2011). Effect of chilling temperature on the long-term survival of rabbit spermatozoa held either in a tris-based or a jellified extender, *Reproduction in domestic animals* 46, 301-308.

Salisbury, J.L. and Floyd, G.L. (1978). Calcium-induced contraction of the rhizoplast of a quadriflagellate green alga, *Science* 202, 975-977.

تأثير إضافة الزيولايت إلى مخفف السائل المنوي للأرانب على جودة الحيوانات المنوية بعد التجميد والإسالة

عامر كاظم محمد[1]، وائل أحمد خليل[2]*، شريف عبد الونيس جبر[1]، محمد الفاتح حماد[1]، حنان فاروق يوسف[3] وأحمد زكى محرز[2]

[1]قسم الإنتاج الحيواني– كلية الزراعة – جامعة طنطا – مصر.

[2]قسم إنتاج الحيوان – كلية الزراعة – جامعة المنصورة – مصر.

[3]قسم الحراريات والسيراميك ومواد البناء – شعبة الصناعات الكيمياوية غير عضوية والثروات المعدنية – المركز القومي للبحوث – مصر.

كان الهدف من هذه الدراسة تقييم تأثير إضافة الزيولايت في مخفف السائل المنوي على حفظ الحيوانات المنوية بالتجميد في الأرانب. تم استخدام 10 ذكور أرانب بصحة جيدة وخصبة، وتم الحصول على القذفات باستخدام المهبل الصناعي. تم جمع و خلط للسائل المنوي لجميع الذكور وتخفيفه بمخفف التريس صفار البيض فركتوز وتم إضافة الزيولايت إليه بتركيزات صفر (الكنترول) و 1% من المخفف (وزن: حجم) وتم ضبط التركيز النهائي للحيوانات المنوية (25 × 10^6 حيوان منوي/مل). تم تعبئة السائل المنوي المخفف في قصيبات (0.25 مل) وتخزينها في النيتروجين السائل (-196 درجة مئوية) لمدة شهر. بعد الإسالة، تم تقييم خصائص الحيوانات المنوية بالسائل المنوي لكل معاملة، بما في ذلك الحركة التقدمية، والحيوية، والتشوهات المورفولوجية، وسلامة الغشاء البلازمي. كما تم تقييم الموت المبرمج بإستخدام جهاز الفلوسيتوميترى والتركيب الدقيق للحيوانات المنوية بإستخدام المجهر الإليكتروني النافذ. تم قياس مضادات الأكسدة الكلية ودلالات الإجهاد التأكسدي في المخفف بعد التجميد والإسالة في كل معاملة. أظهرت النتائج أن المعاملة بالزيولايت حسنت معنوياً خصائص الحيوانات المنوية أثناء فترة الإتزان وبعد التجميد والإسالة. أيضاً أدت المعاملة بالزيولايت إلى زيادة نسبة الحيوانات المنوية السليمة وانخفضت نسبة الحيوانات المنوية ذات الموت المبرمج وذات التنخر معنوياً بالمقارنة بالكنترول بعد التجميد والاسالة، أظهرت المعاملة بالزيولايت إنخفاضاً معنوياً فى مضادات الأكسدة الكلية وزيادة دلالات التأكسد (المالون داى ألدهيد و فوق أكسيد الهيدروجين) في مخفف السائل المنوي بعد التجميد والإسالة مقارنة بالكنترول. الخلاصة: إضافة الزيولايت الى مخفف السائل المنوي أدى إلى تحسين خصائص الحيوانات المنوية للأرانب بعد التجميد والإسالة، عن طريق الحد من نسبة الموت المبرمج وكذلك تلف التركيب الدقيق للحيوانات المنوية والذي يحدث أثناء حفظها بالتجميد.