# دراسة القدرة الحركية للحيوانات المنوية بعد إزالة التجميد وتأثير سائل عنق الرحم في التلقيح الاصطناعي لدى الأبقار

*تاريخ استلام البحث 2002/06/16 - تاريخ قبوله 2003/10/25*

**ملخص**

تناولت هذه الدراسة،جانبين أساسين هما إزالة التجميد للسائل المنوي المستعمل في التلقيح الاصطناعي لدى الأبقار، والمحضر عند درجتي حرارة 35م° و37م°، لمدة خمسة دقائق وتأثير سائل عنق الرحم المأخوذ من أبقار خلال فترة الشبق على القدرة الحركية للحيوانات المنوية.

بينت النتائج المتوصل إليها التناقص التدريجي لكل من الحركة الكلية وسرعة الحيوانات المنوية بعد إزالة التجميد عند درجتي حرارة 35م° و37م°، وهذا مع التقدم في الزمن. غير أن معاملة السائل المنوي مزال التجميد بسائل عنق الرحم أدى إلى تحسين القدرة الحركية خاصة سرعة الحيوانات المنوية وهذا عند درجتي الحرارة المستخدمتين في التجربة.

***الكلمات المفتاحية:*** *سائل منوي مزال التجميد، سائل عنق الرحم، التلقيح الاصطناعي، الأبقار.*

**خليلي كمال**
**عبد النور شريف**
**بولعقود محمد صالح**
**شكريط عبد الرزاق**
قسم البيولوجيا، كلية العلوم
جامعة باجي مختار
ص ب 12 عنابة 23000

**Résumé**

La présente étude porte sur la mobilité et la vitesse des spermatozoïdes, après décongélation à 35 et 37°C. Elle est suivie par l'évaluation du rôle du liquide issu du mucus cervical dans l'activation des spermatozoïdes. La mobilité et la vitesse des spermatozoïdes ont été évaluées à intervalle de 30 minutes.

Les résultats obtenus montrent que la mobilité et la vitesse des spermatozoïdes, diminuent progressivement, en fonction du temps, et indépendamment de la température, mais elles étaient nettement supérieures comparées à celle des spermatozoïdes seuls.

***Mots clés:*** *Liquide séminal, congélation, mucus cervical, mobilité, bovins.*

**Abstract**

The current study has investigated on the principle side of artificial insemination in bovines. The seminal liquid being used in the artificial insemination has been studied, and its effects on the active motility and sperm speed were evaluated. Two different thawing temperatures ( 35°C and 37°C ) for 5 minutes, on one side, and cervical mucus taken from cows during oestrus, on the other side, have been used. The obtained results have indicated a clear sperm active motility, where both total motility and the speed have been decreased progressively with time at both temperatures. The thawed seminal liquid treated with cervical mucus has ameliorated sperm movement, especially the speed at the end of the experiment, and that either at the thawing temperature of 35°C or at 37°C.

***Keywords:*** *seminal liquid, freezing, thawing, cervical mucus, motility, cows.*

**K. KHELILI**
**A. CHERIF**
**M.S. BOULAGOUD**
**A. CHEKRIT**
Département de Biologie
Faculté des Sciences
Université Badji Mokhtat
BP12 Annaba 23000 (Algérie)

**يعتبر** التلقيح الاصطناعي للأبقار من التقنيات الحديثة، المستعملة في أغلب المزارع النموذجية وعند جل المربين على المستوى العالمي ويرجع هذا إلى إيجابيات هذه التقنية المتمثلة في زيادة القدرات الإنتاجية والتكاثرية لدى حيوانات المزرعة بصفة عامة والأبقار بصفة خاصة، وذلك بتحسين نسبة الخصوبة، التحكم في تزامن التلقيح ومراقبة الأبقار خلال الحمل وأثناء الوضع [ 20 ,21] . تأكد أغلب الدراسات التي أجريت في مجال التلقيح الاصطناعي على مستوى المزارع النموذجية، تذبذب النتائج المرتبطة بالتلقيح الاصطناعي، ويعزى هذا إلى العديد من العوامل التي تؤدى غالبا إلى تدهور بعض مؤشرات التكاثر الأساسية ( معامل التلقيح، معامل الإخصاب، نسبة الرجوع...الخ ) [ 5,2 ].

إن اضطراب مؤشرات التكاثر الملاحظة على اغلب المزارع النموذجية خاصة على المستوى المحلي، ترجع في مجموعها إلى العديد من العوامل، أهمها عوامل تقنية ( نقص الخبرة، كثرة الأبقار، نقص الإمكانيات....الخ) وعوامل مرتبطة بتكنولوجية حفظ السائل المنوي في درجات حرارة منخفضة ( خصائص السائل المنوي، الأوساط المغذية

© جامعة منتوري، قسنطينة، الجزائر، 2004.

والحافظة، ضروف التجميد، وسائل التجميد....الخ ) وعوامل مرتبطة بالحالة الفيزيولوجية للأبقار (تغذية، فترة الشبق، بعض الأمراض خاصة تلك المرتبطة بالجهاز التناسلي....الخ) [ 27,26,6,3,1 ] ، بالإضافة إلى طريقة استعمال تقنية التلقيح وتجهيز الأبقار لعملية التلقيح الاصطناعي (خبرة الملقح، وسائل التلقيح، درجة حرارة إزالة التجميد وموضع التلقيح....الخ) [27,26,6,3,1] .

إن لدراسة العوامل التي تساعد أو تعيق النشاط الحركي وحيوية الحيوانات المنوية خلال عبورها الجهاز التناسلي الأنثوي أهمية كبيرة من حيث زيادة الخصوبة، تحسين المستوى الإنتاجي والنهوض بالثروة الحيوانية بصفة عامة والأبقار بصفة خاصة، إذ تؤكد اغلب الأبحاث التي أجريت في هذا المجال أن الخصائص البيولوجية، الفيزيائية- الكيميائية والمناعية لسائل عنق الرحم, لها أهمية كبيرة بالنسبة لنشاط الحركي وحيوية الحيوانات المنوية، مما يسهل عملية عبورها للجهاز التناسلي الأنثوية [ 18,10 ].

يرتكز اهتمامنا بالدرجة الأولى على الخصائص الأساسية للسائل المنوي التي تعتبر من بين الجوانب الضرورية الواجب مراعاتها من أجل إنجاح عملية التلقيح الاصطناعي. سواء قبل عملية التجميد، خلال وبعد عملية التجميد وعلى هذا الأساس قمنا بهذه الدراسة المتمثلة في متابعة مدى تأثير سائل عنق الرحم المأخوذ من أبقار خلال فترة الشبق، على الخصائص الحركية للحيوانات المنوية ( الحركة الكلية والسرعة ) المزال التجميد المستعمل في التلقيح الاصطناعي عند الأبقار من جهة وعملية إزالة التجميد للسائل المنوي عند درجتي حرارة 35 م° و37م° من جهة ثانية.

## الوسائل والطرق

### *الحصول على السائل المنوي*

تم جلب السائل المنوي المعبأ في أنابيب بلاستيكية ذات حجم 0.25 مل ومجمدة عند درجة حرارة –196 م°، من المزرعة النموذجية لتربية الأبقار ( الحجار/ عنابة )، يستعمل هذا السائل المنوي لتلقيح الأبقار. تم استعمال عشرة عينات، لكل حالة إزالة التجميد.

### *الحصول على سائل عنق الرحم*

لقد تم الحصول على سائل عنق رحم أبقار فرنسية من نوع (Frisonne Française Pie Noire F.F.P.N)، والتي كانت في فترة الشبق، حيث تم إجراء دراسة مجهرية وتحليلية لهذا السائل من أجل تقييم مختلف خصائصه الأساسية.

### *تحضير السائل المنوي*

تمت إزالة التجميد للسائل المنوي عند درجة حرارة 35 و 37 م°، لمدة خمسة دقائق باستعمال حمام مائي. كما تم تحضين سائل عنق الرحم في حمام مائي على درجة حرارة 37 م°، وهذا لتفادي صدمة الحرارة على الحيوانات المنوية.

ثم جزئت عينة السائل المنوي إلى قسمين، بحيث يستعمل القسم الأول كشاهد ويتم قياس كل من الحركة الكلية وسرعة الحيوانات المنوية على فترات زمنية مختلفة ( 120,90,60,30 دقيقة )، ويضاف للقسم الثاني سائل عنق الرحم ( حجم من السائل المنوي 0.1 مل / حجم من سائل عنق الرحم 0.1 مل )، يتم بعد ذلك وضع العينات في حاضنة ذات درجة حرارة 37 م°، ثم يتم تقدير نفس المؤشرات السابقة وعلى فترات زمنية مماثلة.

### *قياس النشاط الحركي*

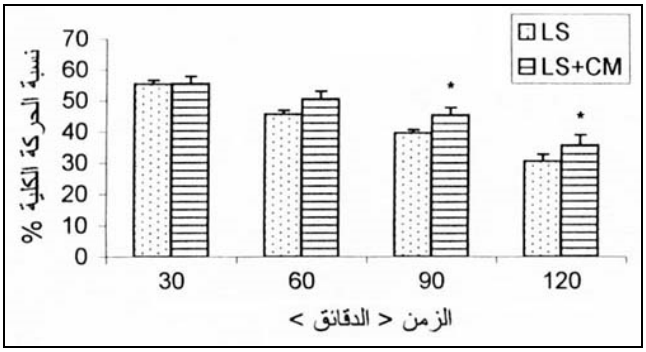
يتم قياس الحركة الكلية للحيوانات المنوية، حسب الطريقة العشرية وتعتمد على حساب عدد الحيوانات المنوية من بين عشرة حيوانات منوية على مستوى مجال الرؤية المجهرية. أما بالنسبة لسرعة الحيوانات المنوية، يتم استعمال شريحة خاصة ذات خطوط متوازية وذات مسافة 0,5 ملم، ثم يحسب الزمن المقطوع بين خطين متوازيين من طرف الحيوان المنوي، حيث يتم قياس سرعة عشرة حيوانات منوية دوى حركة تقدمية على مستوى ثلاث مجالات رؤية مجهرية مختلفة [ 25 ] .

كما تم تحليل النتائج المتوصل إليها باستعمال اختبار الطالب T' test وتحليل التباين لمقارنة النتائج إحصائيا.

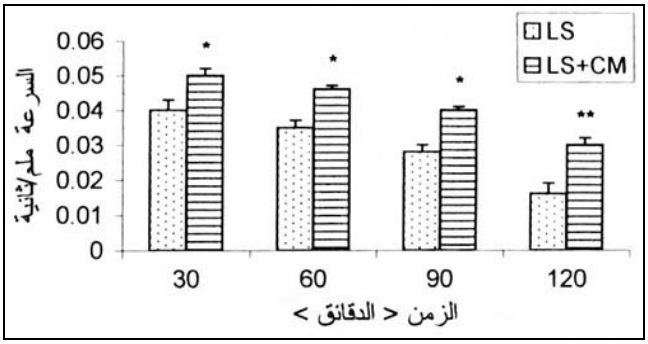
## النتائـــج

تمت الدراسة على السائل المنوي المجمد والذي يستعمل لتلقيح الأبقار اصطناعيا وذلك لمعرفة بعض الخصائص الحركية للحيوانات المنوية ( الحركة الكلية والسرعة) ومدى تأثير سائل عنق رحم الأبقار خلال فترة الشبق، على تحسين خصائص الحيوان المنوي بعد إزالة التجميد عند درجة حرارة 35 م° و 37 م°.

لقد أدت عملية إزالة التجميد عند درجة حرارة 35 م° إلى وصول الحركة الكلية للحيوانات المنوية في بداية التجربة إلى 55% ثم تناقصت الحركة مع التقدم في الزمن إلى حدود 35% بعد ساعتين من بدأ التجربة (شكل 1)، ($p<0.05$ ). نفس الديناميكية لوحظت عند قياس سرعة الحيوانات المنوية (شكل 2) ($p<0.05$ ). أما عند إضافة سائل عنق الرحم إلى السائل المنوي، فكان له تأثير إيجابي، سواء على نسبة الحركة الكلية حيث لم تتناقص بشكل معنوي، أو سرعة الحيوانات المنوية هذه الأخيرة لم تتناقص كثيرا مع التقدم في الزمن، حيث قدرت بحوالي 0.05 ملم/ ثانية بعد نصف ساعة وحوالي 0.03ملم / ثانية عند نهاية التجربة ($p<0.05$ ). بالإضافة إلى أن سرعة الحيوانات المنوية كانت أحسن من تلك المسجلة لدى الحيوانات المنوية الغير معاملة بسائل عنق الرحم خاصة عند نهاية التجربة ( شكل 2,1) ($p<0.01$ ).



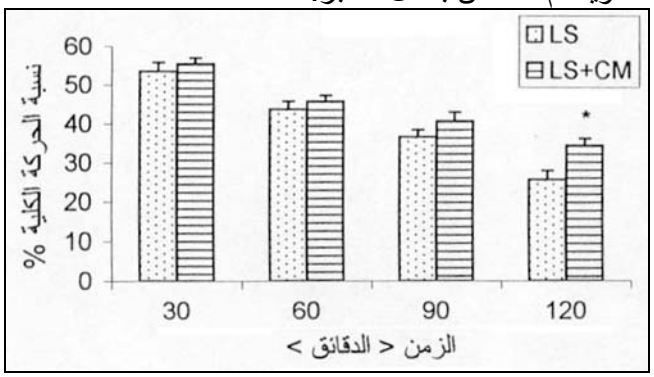

**شكل 1 :** نسبة الحركة الكلية للحيوانات المنوية بعد إزالة التجميد عند 35 م° و مدى فعالية سائل عنق الرحم. ( المتوسط ± الانحراف المعياري، ن= 10 ).( $P<0.05$ )* ؛ ($P<0.01$ )**.



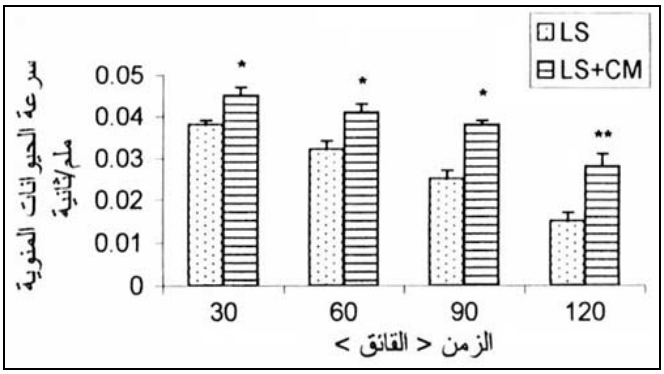

**شكل 2 :** سرعة الحيوانات المنوية بعد إزالة التجميد عند 35 م° ومدى فعالية سائل عنق الرحم. ( المتوسط ± الانحراف المعياري، ن= 10 ).( $P<0.05$ )* ؛ ($P<0.01$ )**

بالنسبة لعملية إزالة التجميد عند درجة حرارة 37 م° لقد أدت إلى نتائج مماثلة سواء بالنسبة للحركة الكلية أو سرعة الحيوانات المنوية، حيث سجل تناقص تدريجي للحركة الكلية مع التقدم في الزمن (شكل3) ($p<0.05$). كذلك سجل تناقص معنوي في سرعة الحيوانات المنوية ( شكل4) ($p<0.01$). كما لوحظ أن نسبة الحركة الكلية وسرعة الحيوانات المنوية لم يتغيرا عن تلك المسجلة في حالة إزالة التجميد عند درجة حرارة 35 م° .

إن إضافة سائل عنق الرحم إلى السائل المنوي أدى إلى تحسين الخصائص الحركية للحيوانات المنوية بعد إزالة التجميد عند درجة حرارة 37 م°، سواء الحركة الكلية أو السرعة وذلك بغض النضر عن التقدم في الزمن ومقارنة مع تلك النتائج في حالة السائل المنوي الغير معامل بسائل عنق الرحم ($p<0.01$) . أما عند الأخذ في الاعتبار عامل الزمن، نجد أن كل من الحركة الكلية وسرعة الحيوانات المنوية لم تتناقص بشكل معتبر.




**شكل 3 :** نسبة الحركة الكلية للحيوانات المنوية بعد إزالة التجميد عند 37 م° ومدى فعالية سائل عنق الرحم. ( المتوسط ± الانحراف المعياري، ن= 10 ).( $P<0.05$ )* ؛ ($P<0.01$ )**.




**شكل 4 :** سرعة الحيوانات المنوية بعد إزالة التجميد عند 37 م° ومدى فعالية سائل عنق الرحم. ( المتوسط ± الانحراف المعياري، ن= 10 ).

## المنـاقشــة

إن التلقيح الاصطناعي للأبقار باعتباره تقنية تستعمل بشكل واسع على مستوى المزارع النموذجية من أجل رفع وتحسين الإنتاج الحيواني، يتوقف على العديد من العوامل. مثل تقنيات تجميد السائل المنوي عند درجات حرارة منخفضة -196 م°، طبيعة الأوساط المغذية والحافظة المستعملة، طبيعة السائل المنوي المستعمل، فيزيولوجية الأبقار ومدى استعدادها لعملية التلقيح الاصطناعي، بالإضافة إلى خبرة الملقح، وسائل التلقيح وتقنية تلقيح وتجهيز الأبقار لعملية التلقيح [ 9,7,2 ] .

تعتبر الخصائص الأساسية للسائل المنوي من المؤشرات الدالة على القدرات الاخصابية للحيوانات المنوية وذلك قبل عملية التجميد أو بعد عملية إزالة التجميد، حيث يجب مراعاة نسبة الحركة الكلية والتقدمية أي تلك الحيوانات المنوية التي لها مسار للحركة، الحيوية ونسبة التشوهات بالإضافة إلى خصائص فيزيائية وكيميائية ( الحجم، اللون، اللزوجة وpH ) [ 22 ].

من خلال النتائج المتوصل إليها، نلاحظ أن الحركة الكلية وسرعة الحيوانات المنوية بعد إزالة التجميد تتناقص تدريجيا مع التقدم في الزمن، وهذا راجع إلى ظروف التجميد وإزالة التجميد، بالإضافة إلى النفاد التدريجي للطاقة، نتيجة استهلاكها من طرف الحيوانات المنوية، كما أن النشاط الحركي للحيوانات المنوية كان ضعيفا، وهذا نتيجة التأثير السلبي لدرجات الحرارة المنخفضة على الحيوانات المنوية خلال عملية التجميد أو بعد إزالة التجميد [ 16,8 ] .

نفس الملاحظة سجلت عند معاملة السائل المنوي بسائل عنق الرحم من أبقار خلال فترة الشبق، غير أن سرعة الحيوانات المنوية كانت أحسن من تلك المسجلة عند الحيوانات المنوية غير المعاملة بسائل عنق الرحم. هذا راجع إلى طبيعة سائل عنق الرحم خلال هذه الفترة التكاثرية حيث يعمل على تحسين القدرات الحركية للحيوانات المنوية لاحتوائه على العديد من المحفزات ذات العلاقة المباشرة أو غير المباشرة بالنشاط الحركي، مثل النظام الأنزيمي كالكارين- كينين والبروستاجلاندين، اللذان يعتبران من الأنظمة التي لها تأثير إيجابي على القدرات التكاثرية بصفة عامة والنشاط الحركي وتقلصات عضلة الرحم بصفة خاصة [ 12,11 ] . هذا بالإضافة إلى تغير الخصائص الفيزيائية والكيميائية لسائل عنق الرحم خلال فترة الشبق ، مما يوفر ظروف جيدة لحيوية الحيوانات المنوية، خـاصة الطاقة وتسهيل الحـركة واكتساب القدرة التي تعتبر ضرورية لعملية إخصاب البويضة [24, 23,11].

تعكس حركة الحيوانات المنوية جانبين من النشاط الوظيفي وهي سلامة جهاز الحركة والسير الحسن للعمليات الأيضية. كما وجدت علاقة وطيدة بين الحركة الكلية وسرعة الحيوانات المنوية ونسبة الخصوبة [ 15 ]. حيث أن عملية إزالة التجميد لها تأثير سلبي على نسبة الخصوبة من خلال تأثيرها على تشوه أغشية الحيوانات المنوية بصفة عامة ومنطقة الأكروزوم بصفة خـاصة [ 17 ] ، ونقص النشاط الحركي للحيوانات المنوية، لذلك يجب اختيار درجات الحرارة المناسبة ومدة الزمن اللازمة لعملية إزالة التجميد من أجل ضمان خصوبة جيدة. كما يجب اختيار موضع وضع الحيوانات المنوية على مستوى الجهاز التناسلي لدى الأبقار، كما تؤكده بعض التجارب، أن الرحم أو بداية قناة فالوب يعتبران منطقتان مثاليتان لوضع الحيوانات المنوية، ويجب تفادي منطقة المهبل أو عنق الرحم [23,21, 8 ] .

إن النتيجة الأساسية التي يمكن الخروج بها من هذه الدراسة التي تعكس إحدى الجوانب الأساسية لتكاثر الأبقار بصفة عامة والتلقيح الاصطناعي بصفة خاصة، هي أن عملية إزالة التجميد تعبر عملية حساسة ومهمة، لأن الحيوانات المنوية تتأثر سلبيا عند انتقالها من وسط ذو درجة حرارة جد منخفضة إلى وسط ذو درجة حرارة في حدود 37 م°. وعلى هذا الأساس يجب التركيز على هذا الجانب المتمثل في اختيار درجة حرارة مناسبة، واختيار زمن قصير لإزالة التجميد. إن تقنية التلقيح الاصطناعي تعتبر أساسية في الوقت الحاضر لما لها من إيجابيات من حيث تحسين القدرات الأخصابية من جهة والإنتاجية من جهة ثانية. كما يجب الاهتمام اكثر والتركيز على مختلف الأبحاث وتطبيقها ميدانيا، بالإضافة إلى الاهتمام أكثر بالثروة الحيوانية بصفة عامة.

## RÉFÉRENCES

**[1]-** Appleyard W.T. and Cook B., "The detection of oestrus in dairy cattle", *Vet. Rec*., 99, (1976), pp.253-256.

**[2]-** de Kruif A., "Factors influencing the fertility of a cattle population", *J. Reprod. Fert*., 4, (1978), pp.507-518.

**[3]-** Kiddy C.A., "Variation in physical activity as an indication of oestrus in dairy cows", *J. Dairy. Scie*., 60, (1977), pp.235-243.

frozen bull semen", *Acta. Vet. Scand*., 34, (1993), pp.299-303.

**[16]-** Soderquist L., "Sperm characteristics and fertility in dairy artif. Insem bulls", Thesis, SLU/Repro, Uppsala, (1991).

**[17]-** Watson P.F., "Recent developments and concepts in cryopreservation of spermatozoa", *Reprod. Fert. Development,* 7, (1995), pp.871-891.

**[18]-** Moghissi K and Kremer F., "Relationship between hight temperature and spermatozoa mortality", *J. Reprod. Med*., 3, (1969), pp.156-160.

**[19]-** Takamine H. and Yoshida F., "Relationship between cervical mucus and spermatozeoa", *Ann. Reprod., Tokyo,Univ. Agric*., 7, (1961), pp.35-40 .

**[20]-** Semkov M. and Nikolov I., "Biologie de la reproduction et de l'insémination artificielle", *eds., Zemizdat, Sofia*, (1987).

**[21]-** Peter P., "Manuel technique de l'insémination artificielle bovine", *1ere eds., Française*, (1991).

**[22]-** Lindemann CB., Fisher M. and Lipton M., "A comparative study of the effects of freezing and frozen storage on intact and demembraneted bull spermatozoa", *Cryobiologie,* 19, (1978), pp.20-28.

**[23]-** Mortimer C., "Séjour des spermatozoïdes dans le cervix", *IOWA state University press, first édition*, (1982), p.285.

**[24]-** Katz D.F. & Dott H.M., "Methods of measuring swimming speed of spermatozoa", *J. Reprod*., 45, (1990), pp.263-272.

**[25]-** OMS, "Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction", *New York, Cambridge University Press*, (1987).

**[26]-** Ducker M.J., Morant S.V., Fisher W.H., and Rosemary A.H., "Nutrition and reproductive performance, first lactation dairy heifers subjected to controlled nutritional regimes", *Anim. Prod.,* 41, (1985), pp.13-22.

**[27]-** Yonguist RS., and Braun WF., "Management of fertility in the cow", *J.A.VM.A.,* 9 (4), (1986), pp.411-414. □

**[4]-** Graves W.M., Dowlen HH., Kiss A. and Riley TL., "Evaluation of uterine body and bilateral uterine horn insemination techniques", *J. Dairy. Scie*., 74, (1991), pp.3454-3456.

**[5]-** Hanzen C., Laurent Y., Lambert E., Delasaux B. and Ectors F., "Etude épidémiologique de l'infécondité bovine", *Ann.Med.Vet*., 134, (1990), pp.105-114.

**[6]-** Nakao T., Moriyocshi M. and Kawata K., "The effect of postpartum ovarian dysfunction and endometritis on subsequent reproduction performance in high and medium producing dairy cows", *Therioganology*, 37, (1992), pp.341-349.

**[7]-** Saacke R.G., "Ce qui arrive quand la semence est congelée puis décongelée", in : *manuel tech. D'insemination artif.bovine,* 1er eds., (1991), pp.37-41.

**[8]-** Saacke R.G. and White J.M., "Semen quality tests and their relationship to fertility", *Pro.4th.Tech.Conf.on AI.Reprod., N.A.A.B*., (1981), pp.22-27.

**[9]-** Millar G., "Préparatifs de l'insémination", in : *manuel tech. D'insemination artif.bovine,* 1er eds., (1991), pp.55-62.

**[10]-** Bratanov K., "Selected papers", *Bul. Acad. Scien*., Sofia, (1981), pp.47-53 .

**[11]-** Khelili K., "Dynamics of blood plasma kallikarein and prekallikarein in pregnant cows", C.R. Acad. Bul. Science, 43 N°2 , (1990), pp.77-79.

**[12]-** Somlev B., Karcheva V. and Khelili K., "Studies on the kalikrein activity of bull's seminal plasma" *Biol.Immun.Reprod*., 16, (1990), pp.38-41.

**[13]-** Hofmo P.O. and Andersen Berg K., "Electron microscopical studies of menbrane injuries in blue fox spermatozoon subject to the process of freezing and thawing" *Cryobiol*., 26, (1989), pp.124-131.

**[14]-** Gwatkin R.B., "The acrosome reaction" in: Fertilization mechanisms in man and mammals", *Plenum Press. New York*, (1977), pp.61-67.

**[15]-** Kjoestad H., Ropstad E. and Andersen BK., "Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of