تأثير تقنية بخار النيتروجين والاوميكا–3 على الموت المبرمج للمايتوكوندريا وتجزؤ المادة الوراثية للنطف

أحمد يونس سعيد* عبد الكريم عبد الرضا هوبي[1] محمد باقر محمد رشاد[2] أحمد علاء الدين العاني[3]

[1] جامعة بغداد–كلية الزراعة [2] جامعة جابر بن حيان للعلوم الطبية [3] وزارة الزراعة–الهيئة العامة للبحوث الزراعية

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة في كلية الزراعة – جامعة بغداد بالتعاون مع المعهد العالي لتشخيص العقم والتقنيات المساعدة على الإنجاب–جامعة النهرين ودائرة البحوث الزراعية–وزارة الزراعة. أستعمل في هذه الدراسة 5 كباش من سلالة العواسي التركية، تم تخفيف السائل المنوي بمخفف الترس، ويبرد بصورة بطيئة إلى درجة حرارة 5مْ وفترة توازن لمدة ساعتين. يعبئه السائل المنوي بالأنابيب الخاصة بالتجميد 0.25 مل، توضع الأنابيب بصورة أفقية من بخار النيتروجين عند وقت 15 دقيقة و 7.5 دقيقة ثم تغطس بالنيتروجين السائل، الأنابيب المجمدة تذوب في محلول الإذابة في درجة حرارة 37 مْ لمدة دقيقة. أن نتائج هذه الدراسة بينت وجود زيادة عالية المعنوية($P<0.01$) لتقنية تعريض العينات لبخار النيتروجين عند لمدة 15 دقيقة لصفات المدروسة للسائل المنوي بالمقارنة مع مدة 7.5 دقيقة من تعريض العينات لبخار النيتروجين. أدت إضافة الاوميكا–3 بتركيز 0.5 و 1% في محلول الإذابة لعينات السائل المنوي إلى تحسن في الصفات المدروسة بالمقارنة مع تركيز 0%، كان هناك تأثير عالي المعنوية للتداخل بين تقنية تعريض العينات لبخار النيتروجين وتراكيز الاوميكا–3 في محلول الإذابة في الصفات المدروسة للسائل المنوي، كما لم يلاحظ أي فروق معنوية بين تركيز 0.5 و 1% من الاوميكا–3 عند مدة 15 دقيقة من تعريض العينات لبخار النيتروجين لصفة حركة وسلامة النطف، وتجزؤ المادة الوراثية، والموت المبرمج للمايتوكوندريا. نستنتج مما تقدم بأن تقنية تعريض العينات لبخار النيتروجين لمدة 15 دقيقة واستعمال تراكيز الاوميكا–3 0.5، 1 % في محلول الإذابة حسن من صفات السائل المنوي.

Effect of liquid nitrogen vapor technique and omega-3 on mitochondrial apoptosis and DNA fragmentation sperm

A. Y. Saieed[1] A. A. Hubi[1] M-Baqir. M. R. Fakhridin[2] A. A. AL-Ani[3]

[1] University of Baghdad - College of Agriculture [2]Jabir Ibn Hayyan Medical University

[3] Ministry of Agriculture – office of Agriculture Research

Abstract

This study has been conducted in college of agriculture – University of Baghdad with cooperation of High institute of Infertility Diagnosis Assisted Technology - Al-Nahrain University and Ministry of Agriculture – Agricultural Research Center. Five Awassi Rams were exposed to study semen samples were diluted

* البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الأول

in tris extender, tris, cooled slowly up to 5 C° and equilibration period for 2 h. Semen was packed into 0.25 ml cryovial, The cryovial were placer horizontally on a rack and frozen in a vapor 4 cm above liquid nitrogen vapor (LN2) for 15 min or 7.5 Min then dipped in liquid LN2.

Frozen cryovial were thawed media at 37C for 1 min. The results of this study There were a high significant ($p<0.01$) increasing of exposing samples to nitrogen vapor technique for the period of 15min in for the studying characteristics semen in comparison with 7.5min of exposing samples to nitrogen vapor. The adding concentrations of omega-3 0.5, 1% to thawing solution due to enhancing in studying characteristics in comparison with concentrations of omega-3 0%. There was a significant effect of the interaction between the exposing samples to nitrogen vapor technique and concentration of omega-3 in thawing solution for the studying characteristics, additionally, no significant differences between 0.5 and 1% concentration of omega-3 in 15min period of nitrogen vapor exposing was observed to the property of motility, membrane integrity, DNA fragmentation and mitochondrial apoptosis. As conclusion from the previous above using of nitrogen vapor exposing technique for period of 15min and using of omega-3 concentration 0.5, 1% due to an enhancing in the studying characteristics semen.

المقدمة

تقنية حفظ المواد الحيوية في الجسم بدرجات حرارة منخفضة هي تقنية وجدت لها العديد من التطبيقات في مجال الطب والتكنولوجيا الحيوية، حيث يمكن تخزين الخلايا والأنسجة في النيتروجين السائل −196 مْ، والعودة إلى الطبيعة الفسيولوجية بدرجات الحرارة الطبيعية (39). تشمل عملية حفظ السائل المنوي عدة خطوات هي التخفيف والتبريد والتجميد والإذابة وكل خطوة من هذه الخطوات تسبب تدهور للنطف، من خلال تعرض النطفة لصدمة البرد أثناء التجميد والتغييرات الطبيعية والكيميائية والبيولوجية نتيجة تعرض النطفة لتجمد الماء داخل وخارج الخلية (14). إن أهم الأسباب الرئيسية لتدهور النطف أثناء التجميد هي صدمة البرد cold shock والإجهاد التأكسدي oxidative stress وصدمة التناضح osmotic shock (1،35).

تشكل الأحماض الدهنية الغير مشبعة (PUFAs) طويلة السلسلة 60% من الغشاء البلازمي للنطف، لدورها المباشر في زيادة سيولة ومرونة الغشاء البلازمي، وزيادة فعالية المستقبلات وزيادة التنظيم الهرموني في الخلية وبالتالي تحسن الحالة الصحية للخلية (8، 29). وبالتالي تلعب الأحماض الدهنية الغير مشبعة (PUFAs) دوراً مهم في اختراق النطفة للبويضة في عملية الأخصاب، ومقاومة صدمة البرد وبما أن البلورات الثلجية المتكونة خلال عملية التجميد تسبب ضرر الغشاء البلازمي للنطفة لذا فأن زيادة سيولة الغشاء البلازمي يزيد من مقاومة النطف لضرر البلورات الثلجية (16، 30). أضافة إلى إن هنالك علاقة بين انخفاض التركيز وحركة النطف بانخفاض تركيز حامض دوكوساهيكسانويك (DHA) في خلايا النطف والبلازما المنوي بتقدم العمر لدى الثيران(18).

إن انخفاض مستوى الأحماض الدهنية الغير مشبعة يؤثر على نفاذية غشاء النطفة وبالتالي يقلل من الفعاليات البايوكيميائية للنطف وتفاعل الاكروسوم والفعاليات الأخرى وبالتالي تأثيرها على عملية الإخصاب (20).

هنالك عده تقنيات مستخدمة في تجميد السائل المنوي منها تقنية التجميد السريع والبطيء التي لها تأثير على حيوية السائل المنوي بعد الإذابة (25) أو تقنية تعريض العينات لبخار النيتروجين قبل التغطيس بسائل النيتروجين (27). لذلك أجريت الدراسة لمعرفه تأثير بخار النيتروجين قبل التغطيس لفتره 7.5 و15 دقيقة وأضافه الاوميكا– 3 بتراك يز 0، 0.5، 1% بعد الإذابة والتداخل بينهما على حركة وسلامة الغشاء البلازمي للنطف وتجزؤ المادة الوراثية والموت المبرمج للمايتوكوندريا.

المواد وطرائق العمل

أجريت هذه الدراسة في كلية الزراعة – جامعة بغداد بالتعاون مع المعهد العالي لتشخيص العقم والتقنيات المساعدة على الإنجاب–جامعة النهرين ودائرة البحوث الزراعية–وزارة الزراعة، للمدة من أيار 2015 ولغاية تشرين الأول 2015. استخدم في هذه التجربة 4 كباش تراوحت بين 2,5 – 3 سنوات وبوزن 75–80 كغم، وتم جمع عينات السائل المنوي ابتداء من الشهر الثالث (أذار) لغرض التدريب والتهيئة للتجربة. ابتدأ من الساعة الثامنة صباحاً، بواقع قذفة لكل كبش في الأسبوع، وباستخدام المهبل الاصطناعي الخاص بالأغنام والماعز، بوجود نعجة بحالة شبق لتحفيز الكباش على الوثوب وجمع السائل المنوي (6)، وتم التأكيد على بقاء مكان وموعد الجمع ثابتين طيلة مدة التجربة.

خففت عينة السائل المنوي بمخفف Tris وتم تحضير المخفف حسب الطريقة التي وصفها (12) وبإضافة صفار البيض 10% والكليسيرول 5% وتم التخفيف بنسبه 1:1 مع مخفف الترس. نقلت العينات بعد إجراء التخفيف (1:20) والتقسيم إلى المعهد العالي لتشخيص العقم والتقانات المساعدة على الإنجاب/جامعة النهرين باستخدام وعاء عازل للحرارة تعبئة السائل المنوي Cryovial وتركت بدرجة درجة حرارة 5 مْ لمدة ساعة ومن ثم نقلت إلى حوض النيتروجين السائل وعرضت العينات لبخار النيتروجين لمدة 7.5 دقيقة مرة ومرة 15 دقيقة في بخار النيتروجين (–75 مْ) ثم غمرة في سائل النتروجين –196 مْ وتركت لمدة شهرين. بعد شهرين من عملية التجميد بالنيتروجين السائل تتم عملية الإذابة بإزالة Cryovial من النيتروجين السائل، ثم يوضع Cryovial في الحمام المائي (Water Bath) عند درجة حرارة 37 مْ ولمدة 5 دقائق ، وبعدها يضاف 1 مل من SMART medium وقبل استعمالها culture medium يتم فلترتها بواسطة فلتر دقيق (0.22 مايكرو مل) ثم يضاف فيها ثلاث مستويات من ألا وميكا – 3 هي 0 ، 0.5 ، 1% وبعدها يضاف إلى كل عينة ثم تركها في الحاضنة لمدة نصف ساعة ليتم تقييم حركة وسلامة الغشاء البلازمي للنطف وقياس تجزؤ المادة الوراثية والموت المبرمج للمايتوكوندريا. قدرت الحركة الفردية للنطف بعد الإذابة بوضع قطره من السائل المنوي المذاب على شريحة دافئة بدرجه حرارة 37 مْ، ويتم قياسها عند قوه تكبير (400x) حسب ما جاء به (15).

قدرت سلامة الغشاء البلازمي Membrane Integrity ويسمى هذا الاختبار water test قدرت النسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي استنادا إلى ما جاء به (21). كما قدر تجزؤ المادة الوراثية DNA Fragmentation باستخدام صبغة الاكردين البرتقالية حسب ما جاء به (36). وتم اختبار الموت المبرمج للمايتوكوندريا Mitochondrial Apoptosis استنادا ما جاء به(40). حللت البيانات أحصائياً باستعمال Statistical Analysis System (33)، وباستعمال التصميم العشوائي الكامل (CRD)، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار (11) متعدد الحدود.

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي بأن تعريض العينات لبخار النيتروجين لمدة 7.5 و15 دقيقة على وجود فروق عالية المعنوية (P<0.01) بين الفترتين على الصفات المدروسة بالتجربة حيث سجلت حركة وسلامة الغشاء البلازمي للنطف عند فترة 15 دقيقة (33.04 ± 0.42 و 37.28 ± 0.45 %) على التوالي، في حين سجلت فترة 7.5 دقيقة أعلى نسبة مئوية للموت المبرمج للمايتوكوندريا وتجزؤ المادة الوراثية (80.39 ± 0.26 و6.40 ± 0.07 %) على التوالي جدول1.

جدول 1 تأثير تعريض العينات لبخار النيتروجين خلال فترة (7.5 و15 دقيقة) على الصفات المدروسة للسائل المنوي (المتوسط الحسابي ± الخطأ القياسي)

الصفات السائل المنوي المدروسة	تعريض العينات لبخار النيتروجين لمدة (7.5 دقيقة)	تعريض العينات لبخار النيتروجين لمدة (15 دقيقة)
الحركة الفردية (%)	^{b}0.31 ± 30.03	^{a}0.42 ± 33.04
سلامة الغشاء البلازمي (%)	^{b}0.29 ± 34.43	^{a}0.45 ± 37.28
الموت المبرمج للمايتوكوندريا (%)	^{a}0.26 ± 80.39	^{b}0.34 ± 77.86
تجزؤ المادة الوراثية (%)	^{a}0.07 ± 6.40	^{b}0.07 ± 6.02

*المتوسطات التي تحمل أحرف مختلفة ضمن الصف نفسه تختلف معنويا (P<0.01)

هنالك العديد من العوامل التي تؤثر على فعالية النطف بعد الإذابة منها نوع المواد الحافظة وتركيزها (25)، طريقة جمع السائل المنوي (23)، ودرجة حرارة السائل المنوي عند أضافة الكليسيرول وطريقة التجميد (19) ونوع المخفف (7)، وفي الدراسة الحالية تم استخدام تقنية بخار النيتروجين، حيث تم تعريض العينات لبخار النيتروجين لفترة 7.5 و15 دقيقة، وأظهرت النتائج تفوق عالي المعنوية (P<0.01) لفترة 15 دقيقة بالمقارنة مع 7.5 دقيقة. خلال دراسته (24) في تأثير تقنية التجميد البطيء والسريع على السائل المنوي للكباش تفوق معنوي (p<0.05) لحركة النطف بعد الإذابة بين الطريقتين، بينما لم يلاحظ وجود فروق معنوية لصفة سلامة الكروسوم وتجزؤ المادة الوراثية والموت المبرمج للنطف بين الطريقتين. اتفقت نتيجة (32) مع نتائج دراستنا حيث أستخدم تقنية بخار النيتروجين التي تفوقت معنوياً (p<0.05) على تقنية التجميد التدريجي للسائل المنوي للإنسان بعد الإذابة. الدراسة التي أجراها (27) للمقارنة بين تقنية التجميد البطيء وتقنية تعريض العينات لبخار النيتروجين لمدة 10 دقائق قبل التغطيس بالنيتروجين السائل للسائل المنوي للكباش لاحظ تفوق معنوي لتقنية التجميد البطيء، حيث سجلت الحركة التقدمية بعد الإذابة (15.3 ± 3.0) بالمقارنة مع تقنية بخار النيتروجين (8.8 ± 0.9).

أوضحت نتائج التحليل الإحصائي جدول 2 عدم وجود فروق معنوية بين تركيز 0.5 و1% من الاوميكا-3 على النسبة المئوية لحركة وسلامة الغشاء البلازمي للنطف (32.75 ± 0.48 و32.68 ± 0.48 %) و (37.10 ± 0.48 و37.04 ± 0.49 %) على التوالي مقارنتاً مع تركيز0% من الاوميكا-3 (29.18 ± 0.37 و33.44 ± 0.36 %) لكلا الصفتين أعلاه على التوالي. في حين سجلت صفة الموت المبرمج للمايتوكوندريا أعلى نسبة مئوية عند تركيز0% من الاوميكا-3 (80.80 ± 0.33 %). لم يلاحظ أي اختلافات معنوية بين التراكيز 0.5 و1% لصفة تجزؤ المادة الوراثية (6.05 ± 0.10 و6.14 ± 0.09%) مقارنة مع تركيز0% من

الاوميكا –3 الذي سجل فروق عالية المعنوية (P<0.01) بين التراكيز الأخرى لتجزؤ المادة الوراثية (6.45 ± 0.09 %).

جدول 2 تأثير التراكيز المختلفة للاوميكا–3 في محلول الإذابة على الصفات المدروسة للسائل المنوي بعد الإسالة (المتوسط الحسابي ± الخطأ القياسي)

الصفات السائل المنوي المدروسة	الاوميكا –3 (G1) (0%)	الاوميكا –3 (G2) (0.5%)	الاوميكا –3 (G3) (1%)
الحركة الفردية (%)	29.180.37 ± [b]	32.750.48 ± [a]	32.680.48 ± [a]
سلامة الغشاء البلازمي (%)	33.440.36 ±[b]	37.100.48 ± [a]	37.040.49 ± [a]
الموت المبرمج للمايتوكوندريا (%)	80.800.33 ± [a]	78.220.44 ± [b]	78.350.36 ± [b]
تجزؤ المادة الوراثية (%)	6.450.09 ± [a]	6.050.10 ± [b]	6.140.09 ± [b]

* المتوسطات التي تحمل أحرف مختلفة ضمن الصف نفسه تختلف معنويا (P<0.01)

في دراستنا الحالية أدى استخدام الاوميكا–3 في محلول الإذابة (SMART media) بتركيز 0.5 و1% إلى تحسن في الصفات المدروسة للسائل المنوي بالتزامن مع تقنية بخار النيتروجين بالمقارنة مع تركيز 0% من الاوميكا–3 وفترة 7.5 دقيقة من تعريض العينات لبخار النيتروجين. اختلفت الدراسات في طريقة استخدام الاوميكا–3 لتحسين صفات السائل المنوي لحيوانات المزرعة، بعض الدراسات استخدمت الاوميكا–3 عن طريق التغذية حيث حسنت من حركة النطف بعد الجمع في الثيران لكن لم يكن لها دور في حماية النطف خلال عملية التجميد والأذابة (13). لم يلاحظ (9) أي تحسن معنوي لصفات السائل المنوي للخنازير عن طريق التغذية. إن الاختلافات الحاصلة في حركة النطف وسلامة الغشاء البلازمي خلال أضافة الاوميكا–3 إلى محلول الإذابة يعود سببه إلى قدرة الاوميكا–3 إلى زيادة سيولة الغشاء البلازمي مما يحسن من قابليتها الحركية، كما إن سيولة الغشاء البلازمي تزيد من قابلية الغشاء مقاومة الضرر الناجم بفعل التغير في الضغط الازموزي أثناء عملية الإذابة (22). استخدم (5) حامض الفا–لينولينك (α-Linolenic acid) بتراكيز 0، 3، 5، 10، 15 نانو غرام. مل$^{-1}$ لاحظوا تحسن صفات السائل المنوي للثيران بعد التبريد والتجميد عند تركيز 5 نانو غرام. مل$^{-1}$.

بينت نتائج التحليل الإحصائي لتأثير فترة تعريض العينات لبخار النيتروجين 7.5 و15 دقيقة وتراكيز الاوميكا–3 المختلفة جدول3 تفوق عالي المعنوية (P<0.01) للحركة الفردية للنطف بعد الإذابة لفترة 15 دقيقة \ G2 و G3 (27.74 ± 0.37) بالمقارنة مع فترة 7.5 دقيقة \ G1 (34.48 ± 0.77 و 34.02 ± 0.72 %) على التوالي. لم تظهر أي فروق معنوية بين فترة 7.5 دقيقة\ G2 و G3 و (15 دقيقة \G1) للنسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي للنطف (35.22 ± 0.41 و 35.68 ± 0.53 و 34.48 ± 0.56 %) على التوالي. انخفضت النسبة المئوية للموت المبرمج للمايتوكوندريا عند فترة 15 دقيقة \ G2 و 3G (76.88 ± 0.70 و 77.17 ± 0.47 %) على التوالي. سجلت فترة 7.5 دقيقة\G1 و G2 و G3 اعلى نسبة مئوية لتجزؤ المادة الوراثية للنطف بالمقارنة مع فترة 15 دقيقة\G2 (6.65 ± 0.12 و 6.28 ± 0.13 و 6.28 ± 0.13 و 5.82 ± 0.15 %) على التوالي.

جدول 3 تأثير تداخل تعريض العينات لبخار النيتروجين خلال فترة (7.5 و15 دقيقة) مع التراكيز المختلفة للاوميكا-3 (0، 0.5 ،1%) في محلول الإذابة على الصفات المدروسة للسائل المنوي بعد الإسالة

الصفات السائل المنوي المدروسة	تعريض العينات لبخار النيتروجين لمدة (7.5 دقيقة)			تعريض العينات لبخار النيتروجين لمدة (15 دقيقة)		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3
الحركة الفردية (%)	27.74 ±0.37 ^{c}	31.02 ±0.44 ^{b}	31.34 ±0.58 ^{b}	30.62 ±0.56 ^{b}	34.48 ±0.77 ^{a}	34.02 ±0.72 ^{a}
سلامة الغشاء البلازمي (%)	32.40 ±0.41 ^{c}	35.22 ±0.41 ^{b}	35.68 ±0.53 ^{b}	34.48 ±0.56 ^{b}	38.97 ±0.76 ^{a}	38.40 ±0.78 ^{a}
الموت المبرمج للمايتوكوندريا (%)	82.05 ±0.35 ^{a}	79.57 ±0.43 ^{b}	79.54 ±0.47 ^{b}	79.54 ±0.47 ^{b}	76.88 ±0.70 ^{c}	77.17 ±0.47 ^{c}
تجزؤ المادة الوراثية (%)	6.65 ±0.12 ^{a}	6.28 ±0.13 ^{ab}	6.28 ±0.13 ^{ab}	6.25 ±0.12 ^{b}	5.82 ±0.15 ^{c}	6.00 ±0.12 ^{bc}

* المتوسطات التي تحمل حروفا مختلفة ضمن الصف تختلف معنويا فيما بينها (P<0.01) . G1: تركيز (0%) من الاوميكا-3 ، G2: تركيز (0.5%) من الاوميكا-3، G3: تركيز (1%) من الاوميكا-3

ذكر (3) إن العمل التعاوني بين فيتامين E والحامض الدهني دوكوساهيكسانويك (DHA) عند أضافته بتركيز (10 نانو غرام. مل$^{-1}$) في مخفف السائل المنوي للماعز أدى إلى تحسن في حركة وحيوية النطف بعد الإذابة بالمقارنة مع معاملة السيطرة. أختلف الدراسة التي أجراها (34) مع نتائج دراستنا حيث أدى إلى حصول انخفاض معنوي لحركة نطف الثيران عند إضافة الاوميكا-3 إلى مخفف سترات الصوديوم بعد الإذابة. كما لم يلاحظ (37) عند أضافة الاوميكا-3 إلى مخفف السائل المنوي للكباش أي فروق معنوية للحركة الفردية للنطف والنطف الميتة والمشوهة بالمقارنة مع معاملة السيطرة. إن اختلاف النتائج بين الدراسات في تأثير إضافة الاوميكا-3 لمخفف السائل المنوي قد يعود إلى عدة أسباب أهمها طريقة عملية التجميد والأذاة والتراكيز المستعملة بالتجربة ونوع المخفف المستخدم. أن المستوى العالي من أصناف الأوكسجين الفعال سبب أساسي في ضرر المادة الوراثية وتعطيل عمل الغشاء الخارجي والداخلي للمايتوكوندريا وبالتالي انطلاق العوامل المحفزة للموت المبرمج وأهمها السايتوكروم(Cytochrome-C) والكاسبازات(Caspase) (31).

إن ارتفاع النسبة المئوية لتجزؤ المادة الوراثية للنطف كأن بفعل دور أصناف الأوكسجين الفعال (ROS) في تحفيز عمل السيتوكروم (cytochrome-C) والكاسبيازات الميتة (Caspase-9, 3) التي لها دور في أحداث كسر في شريط المادة الوراثية (Potts وزملاؤه، 1999). أتفق نتائج دراستنا مع ما ذكره (10) و (26) على إن عملية التجميد أدت إلى تدهور في صفات السائل المنوي مما يبين بان الانخفاض في حركة النطف بعد الإذابة كأن بفعل خلل في جهد غشاء المايتوكوندريا للنطف MMP (Mitochondrial Membrane Potential). في نتائج دراستنا ارتفعت النسبة المئوية للموت المبرمج للمايتوكوندريا للمعاملة السيطرة بالمقارنة مع المعاملات الأخرى، كذلك بين مرحلة قبل التجميد وبعد الإذابة مما أثرت على حركة النطف وهذا ما أكده (17) عندما ربط بين الحركة التقدمية للنطف الكباش وبين فعالية المايتوكوندريا خلال عملية تبريد السائل المنوي، حيث لاحظ انخفاض في حركة النطف يصاحبها خلل في عمل المايتوكوندريا بسبب عملية التبريد. إن عملية التبريد والتجميد والأذاة لها دور أساسي في أحداث خلل في تنظيم مستوى

أيون الكالسيوم بفعل خلل في نفاذية غشاء المايتوكوندريا مما يزيد من مستوى أيون الكالسيوم في السايتوبلازم وبذلك يحفز عمل أنزيمات البروتيز Protease، ألأندونكلياز Endonucleases، الفوسفاليبيز Phospholipase وأدينوسين ثلاثي الفوسفاتيز ATPase والتي تسبب دنترة البروتينات وتحطيم الدهون في الغشاء البلازمي وضرر المادة الوراثية (2، 4).

المصادر

1- Aitken, R. and C. Krausz, 2001.Oxidative stress, DNA damage and the Y. chromosome. Reproduction. Oct; 122(4):497-506.

2- Aman, R. and J. Parks, 1994. Effect of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro matured bovine oocytes. Biology of Reproduction. 50 (1):103-110.

3- Ansari, M., A. Towhidi, M. Shahrbabak and M. Bahreini, 2012. Docosahexaenoic acidandalpha-tocopherol improves sperm cryo survival in goat. Slovak J. Anim. Sci., 45, (1): 7-13.

4- Aslanidi, K., G. Aslanidi and D. Vachadze, 1997. Apossible role of cold-induced ionic stress in coldinduced cell death. Membrane and Cell Biology. 11(1):57-76.

5- Asmatullah, K., W. Haron, R. Yusoff, Y. Nurhusien, A. Khumran. S. Kazhal, A. Atique, U. Behan, M. Kaka and M. Ebrahimi, 2015. α -Linolenic acid supplementation in BioXcell® extender can improve the quality of post-cooling and frozen-thawed bovine sperm. Animal Reproduction Science 153 (1–7).

6- Badawy, A., A. Yaseen, A. El-Bashary, and M. Ibrahim, 1975. Effect of sexual preparation on some characteristics of the semen of buffaloes and cattle bulls. Alexandria J. Agric. Res., 21: 185-191. (Anim. Breed. Abstr., 43: 1055).

7- Bohlooli, S., C. Fatin, and R. Sarain, 2012. The Effect of Different Extenders on Post-thaw Sperm Viability, Motility and Membrane Integrity in cryopreserved semen of Zandi Ram. Basic.Appl.Sci.Res. 2(2):1120-1123.

8- Calder, P., 2011. Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. Eur J Pharmacology. 668 Suppl.1:S50–8.

9- Castellano, C., I. Audet, J. Bailey, J. Laforest and J. Matte, 2010.Dietary omega-3 fatty acids (fish oils) have limited effects on boar semen stored at 17 C° or cryopreserved. Theriogenology 74 (8), 1482–1490.

10- Connell, O., N. McClure, and S. Lewis, 2002. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function Hum. Reprod. 17 (3): 704-709.

11- Duncan, D., 1955. Multiple Rang and Multiple F-test. Biometrics. 11: 42−4.

12- Evans, G. and Maxwell, W. M. C. 1987. Salomon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butter worth's, Sydney, pp. 194.

13- Gholami, H., M. Chamani, A. Towhidi and M. Fazeli, 2010. Effect of feeding docosahexaenoic acid-enriched nutriceutical on the quality of fresh and frozen-thawed semen in Holstein bulls. Theriogenology 74 (9), 1548–1558.

14- Gillan, A., B. Lindsay, W. Chis, and A. Maxwell, 2004. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination Evans www.publish.csiro.au/journals/rfd.

15- Graham, E., M. Schmehl, and M. Maki-Laurila, 1970.Some physical and chemical methods of evaluating semen. In: Proc. 3rd NAAB Tech. Conf. Artif. Insemin. Reprod., 12–14 April Milwaukee, WI. National Association of Animal Breeders, Columbia, MO, p. 44-48.

16- Gulliver, C, M. Friend, B. King, and E. Clayton, 2012. The role of Omega-3 polyunsaturated fatty acids in reproduction of sheep and cattle Anim.Reprod.Scie,131:9-22.

17- Holt, V., 1997. Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. Report.Fertil.Dev. 9, 309-319.

18- Kelso, K., A. Redpath, R. Noble and B. Speake, 1997. Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls. Reproduction and Fertility, vol.109, p. 1-6.

19- Kemal, A.; Ü. Cgrgti, Z. Nur, S. Bacinoglu, S. Pabuccuoglu, Ö, Özdag, and S. Bgrler, 2010. Effects of Extender Osmolarity, Cooling Rate, Dilution Rate and Glycerol Addition Time on Post-thaw Ram Semen Characteristics and Fertilization. Research Article.J. Fac.Vet.Med. Istanbul Ü.36 (2):33-46.

20- Koppers, A., M. Garg, and R. Aitken, 2010.Stimulation of mitochondrial reaction oxygen species production by unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. Free Radical Biol.Med., 48:112-119.

21- Lomeo A. and A. Giambersio, 1991. Water-test: a simple method to assess sperm-membrane integrity. Int J Androl, 14, 278-282.

22- Maldjian, A., F. Pizzi, T. Gliozzi, S. Cerolini, P. Penny, and R. Noble, 2005. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. Theriogenology 63 (2), 411–421.

23- Marco-Jime´nez, F., S. Puchades, J. Gadea, M. Vicente, and M Viudes-de-Castro, 2005. Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa. Theriogenology 64:1756–1765.

24- Nur, Z., Z. Berrin, U. Burcu, T. Serife, S. Hakan, G. Cansel, G. Ulgen, and D. Ibrahim, 2011.Effect of freezing rate on acrosome and chromatin integrity in ram semen.Ankara University Vet Fak Derg, 58: 267-272.

25- Ongun U., and M. Bucak, 2009. The role of different trehalose concentrations and cooling rates in freezing of ram semen. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 56, 99-103.

26- Ozkavukcu, S., E. Erdemli, and A. Isik, 2008. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa J Assist Reprod Genet. 25(8): 403–411.

27- Pfananani H. 2012. Cryopreservation of south African indigenous ram semen. Thesis Master. Faculty of Natural and Agricultural Sciences-University of the Free State Bloemfontein.

28- *Potts, R., C. Newbury, and G. Smith, 1999. Sperm chromatin damage associated with male smoking. Mutat Res.423:103-11.*

29- Poulos, A and L. White, 1973. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1973, vol. 46, p. 541-549.

30- Royere, D., C. Barthelemy, S. Hamamah, and J. Lansac, 1996. Cryopreservation of spermatozoa: A review Hum.Reprod. Update. 2:553-559.

31- Sakkas, D., E. Mariethoz, G. Mnicsirdi, D. Bizzaro, P. Bianchi, and U. Bianchi, 1999. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. Rev. Reprod. 4, 31–37.

32- Sandro, C., M. Deborah, P Spaine, P. Agnaldo and S. Cedenho, 2003. Effects of technique of cryopreservation and dilution/ Centrifugation after thawing on the motility and vitality of spermatozoa of Oligoasthemozoospermic men. . Int. Braz. J. Urol. 29: 133-40.

33- SAS. 2012. Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA.

34- Sheikholeslami K., J. Arshami, A. Naserian, and A. Abavisani, 2013. The effects of addition of omega-3, 6, 9 fatty acids on the quality of bovine chilled and frozen-thawed sperm. Open Veterinary Journal,Vol. 3(1): 47-52.

35- Sikka, S., 2001. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. Current Medical Chemistry. Jun; 8(7): 851-862. Review.

36- Tejada, R., J. Mitchell and A. Norman, 1984. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. Fertil. Steril. 42(1):87-91.

37- Towhidi, A. S. Zeinoaldini, R. Ardebili, N. Davachi, and A. Nasiri, 2013. Combined n-3 fatty acids and _-tocopherol supplementation improved the ovine sperm cryosurvival. Iran. J. Biotechnol. 11 (4), 238–243.

38- Watson, P., 2000.The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science.Jul 2;60 – 61:481-492. Review.

39- Woods, E, J. Benson, and Y. Agca, 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. Cryobiology. 48(2):146-156 .

40- Ying Chen, Y., L. Debora, and P. Kramer, 2001. Apoptotic Signaling in Polyamine Analogue-treated SK-MEL-28 Human Melanoma Cells1. Grace Cancer Drug Center, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, New York.61, 6444 _ 6437.