

تأثير إضافة السكروز والتريهالوز في الكفاءة الإخصابية للسائل
المنوي المجمد لكباش العواس

**The effect of adding sucrose and trehalose on the fertilization
efficiency of frozen thawed semen of Awassi rams**

إعداد الطالب المهندس

عبد المجيد يسوف

إشراف

المشرف المشارك

د. منصور أحمد

المشرف

د. محمد الصالح

الأستاذ المساعد في كلية الزراعة – جامعة دمشق باحث في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية

موعد المناقشة العلنية: يوم الأربعاء الموافق 2022/3/30 الساعة العاشرة صباحاً في المدرج الجديد
في كلية الزراعة.

الملخص

أجريت الدراسة لتحديد تأثير نسبتي الحمل والولادة بـ (1) إضافة السكروز والتريهالوز إلى ممددات السائل المنوي. (2) إضافة rFSH أو eCG أو تراكيوز مختلفة من hMG منفردة أو بالمشاركة مع eCG في سياق برنامج Ovsynch. (3) مستوى الغلوكوز والجليسيريدات الثلاثية حول وقت التلقيح. إضافة إلى تحديد تأثير موجات المناسل أنفة الذكر في بعض المؤشرات الاستقلابية المهمة.

مُدّد السائل المنوي المجموع باستخدام المهبل الصناعي بمحاليل تمديد معتمدة على صفار البيض، أضيف إليها تركيز مختلف من السكروز والتريهالوز منفردين أو مجتمعين معاً قبل التجميد. قُيِّمت المؤشرات الحركية للسائل المنوي حاسوبياً باستخدام الـ CASA. لُقِّحت 63 نعجة صناعياً بعد توزيعها عشوائياً إلى سبع مجموعات متساوية العدد، ووقّعت الإباضة عندها باستخدام برنامج Ovsynch بالمشاركة مع الهرمونات أنفة الذكر لتحريض النمو الجريبي. تمّت مراقبة الجريبات المبيضية بجهاز الأمواج فوق الصوتية المزوّد بمسيرٍ خطّي عبر المستقيم بتردد 7.5 MHz. جُمعت عينات الدم من الوريد الوداجي للنعجات، ولمدة خمسة أيام بدءاً من يوم حقن $PGF_{2\alpha}$ وموجات المناسل، وقيست مستويات كل من الغلوكوز والجليسيريدات الثلاثية والكوليسترول واليوريا باستخدام المطياف الضوئي. تم كشف الشبق بعد حقن الجرعة الثانية من هرمون GnRH بمعدل مرة كل 8 ساعات حتى بعد انتهاء ظهور علامات الشبق. شُخّص الحمل بجهاز الأمواج فوق الصوتية في اليوم 37 بعد التلقيح. حُلِّلت البيانات الناتجة باستخدام برنامج SAS[®] 9.2. قورنت الفروقات بين متوسطات المؤشرات المدروسة بحسب اختبار TUKEY المدرج ضمن تعليمة GLIMMIX.

بالرغم من أن نتائج التحليل الحاسوبي CASA لم تسجل فروقاً إحصائية ($P>0.05$) بين المجموعات في مؤشر الحركة العامة للنفط بعد الإذابة بـ 10 دقائق، إلا أن أفضل النتائج كانت عند استخدام السكروز أو التريهالوز بتركيز 50 ملي مول، وبلغت الحركة العامة 68.33% و68.00% على التوالي. أدت إضافة واقبي البرودة بتركيز مرتفعة (100 ملي مول) إلى انخفاض معدل الحركة العامة، وكان الانخفاض كبيراً ($P<0.05$) عند تركيز 100 ملي مول من السكروز. لم يكن لإضافة واقبات البرودة منفردة تأثير إيجابي معنوي ($p>0.05$) بخصوص نسبة النفط ذات الحركة السريعة أو المتوسطة أو البطيئة أو الساكنة بعد إذابة القشات بـ 10 دقائق، إلا أن مشاركة السكروز والتريهالوز معاً أدت إلى زيادة كبيرة ($p<0.05$) في نسبة النفط ذات الحركة السريعة التي بلغت 18.67%، وفي معدل سرعة مسار النفط الذي بلغ 75.67 ميكروناً/ثا، وفي متوسط السرعة الخطية المستقيمة للنفط التي بلغت 135.33 ميكروناً/ثا، ولكنها أدت إلى انخفاض معنوي ($p=0.03$) في متوسط سرعة مسار النفط بعد 45 دقيقة من الإذابة. يمكن القول عموماً

إن النطف حافظت على مؤشرات الحركة بعد 45 دقيقة من الإذابة ولم تُسجل انخفاضات كبيرة ($p>0.05$) فيها. كما يلاحظ تقارب نسبة الحمل في المجموعات التي أُضيف لها السكرز أو التريهالوز منفرداً سواء بتركيز منخفض أو مرتفع، وكانت نسبة الحمل الأعلى في المجموعة التي أُضيف إليها كلا واقبي البرودة إذ بلغت 77.78%. كذلك لم تسجل فروق معنوية في معدل الولادات بين المجموعات التجريبية، وكانت أقل نسبة في مجموعتي الشاهد والسكرز بتركيز مرتفع إذ بلغت 44.45%.

لم تُسجل أي فروق معنوية ($p>0.05$) في متوسطات أعداد الجريبات متوسطة الحجم على مبايض نعجات مجموعات الدراسة بعد 24 ساعة من حقن موجه المناسل، إلا أن الفروق تمايزت بعد 48 ساعة، وكانت أكثر أعداد الجريبات عند مجموعة hMG5، وبلغت أعدادها 9.6 جريباً متوسطاً، وأقلها عند مجموعة hMG25، وبلغت أعدادها 6.33 جريبات. لم يسجل وجود جريبات كبيرة الحجم عند ابتداء المعاملة الهرمونية أو بعده بـ 24 ساعة عند نعجات جميع المجموعات، وسُجل وجود جريبات كبيرة الحجم عند نعجات المجموعات المعاملة بمستويات مرتفعة من موجهي المناسل hMG و rFSH (مجموعة hMG25 و rFSH25) فقط، إذ بلغت أعداد الجريبات الكبيرة 3.5 و 3.17 جريباً على التوالي. كان قطر الجريب الإباضي عند نعجات معظم المجموعات متقارباً ($P>0.05$) ما عدا نعجات مجموعة hMG15 والتي بلغ قطر الجريب الإباضي فيها بعد المعاملة الهرمونية بـ 48 ساعة 5 مم. كان النمو الجريبي بعد 24 ساعة من حقن موجّهات المناسل eCG أو hMG أو rFSH متقارباً عند نعجات جميع المجموعات، ولم ترتق الاختلافات بين المجموعات إلى مستوى المعنوية الإحصائية ($p>0.05$) ما عدا مجموعتي rFSH و hMG15 ($p<0.05$) اللتين بلغ عندهما متوسط النمو الجريبي بين 1.10 و 1.52 مم/اليوم على التوالي. كان التباين أكثر وضوحاً ($p<0.05$) بين بعض المجموعات بعد 48 ساعة من حقن موجّهات المناسل، إذ أدى حقن eCG بمفرده أو بالمشاركة مع hMG إلى أعلى نمو جريبي في المجموعات وبلغ متوسط النمو الجريبي 1.95 و 2.23 على التوالي، وكان أقل معدل نمو جريبي عند النعجات المعاملة بـ 15 وحدة دولية من hMG، وبلغ 1.31 مم/اليوم. كما لم تؤثر مشاركة موجّهات المناسل مع برنامج توقيت الإباضة معنوياً ($P>0.05$) في نسبة الحمل والولادة عند النعجات.

أظهرت جميع نعجات الشبق في أوقات متقاربة، ولم تُسجل فروق إحصائية ($p>0.05$) بين المجموعات في بدايته أو نهايته. كذلك لم تُسجل فروق إحصائية ($p>0.05$) بمستوى الطاقة سواء كانت غلوكوز أم غليسريدات ثلاثية عند النعجات الحوامل وغير الحوامل، فقد تأرجح تركيزهما انخفاضاً وارتفاعاً حول القيمة الفيزيولوجية لكل منهما. إضافة لذلك لم تؤثر المعاملة بمختلف موجّهات المناسل في المؤشرات الاستقلابية الكوليسترول واليوريا عند نعجات العواس.

يُستنتج من الدراسة الحالية أنه بالرغم من إضافة السكروز والتريهالوز لمحلول تمديد السائل المنوي أدت إلى تحسّن بعض المؤشرات الحركية للنطف إلا أنها لم تؤدّ إلى زيادة معنوية في معدلي الحمل والولادات، ولم يُسجّل تأثير تضامني بينهما. وأنه يمكن استخدام مختلف موجهات المناسل بالمشاركة مع برنامج توقيت الإباضة دون أن تؤثر في نسبي الحمل والولادة. وأن نسبة الحمل والولادة لم تتأثرا سلباً بمستوى الغلوكوز والجليسيريدات الثلاثية، كما أن استخدام موجهات المناسل آمن، ولم يؤثر في معدلات الاستقلاب عند نعجات العواس.

الكلمات المفتاحية: كباش العواس، التريهالوز، السكروز، CASA، eCG، hMG، rFSH، Ovsynch، الغلوكوز، الغليسيريدات الثلاثية.

Abstract

The aim of the present study was to determine if pregnancy and lambing rates could be affected by 1) Adding sucrose and trehalose to semen diluents 2) Administration of rFSH, eCG or different concentrations of hMG alone or in combination with eCG in context of Ovsynch protocol 3) Levels of glucose and triglyceride at prei AI, in addition to determine the effect of gonadotropins on some metabolic parameters. Semen was collected using an artificial vagina from nine rams and diluted using different concentrations of sucrose and trehalose alone or in combination. The diluted semen was filled in 0.5 mL straws, frozen using a programable freezing device, and stored in liquid nitrogen until thawing. Six straws were withdrawn randomly from each treatment group, thawed and pooled in an Abendorff tube for assessment using CASA. Sixty-three Ovsynch – synchronized ewes were artificially inseminated using frozen/thawed straws. Ovarian follicles were monitored ultrasonically by 7.5 MHz transrectal linear probe. Blood samples were collected via jugular venipuncture from 63 ewes for five days starting from the day of PGF_{2α} and gonadotropins administration to determine the levels of glucose, triglycerides, cholesterol and urea using spectrophotometer. Estrus symptoms were detected by an aproned ram after the second dose of GnRH once every 8 hours, until the signs of estrus had ceased appear.

Pregnancy was ultrasonographically diagnosed on day 37 after AI. The differences between parameters, if present, were compared using the TUKEY test available in the GLIMMIX procedure (SAS® 9.2).

The results of the CASA didn't exhibit significant difference ($P>0.05$) of adding impermeable cryoprotectants on motility 10 min after thawing, and the best results were when sucrose or trehalose were added at a concentration of 50 mmol, and the motility was 68.33 and 68%, respectively. However, higher concentrations (100 mmol) of cryoprotectants significantly ($P<0.05$) decrease the motility. No significant difference ($P>0.05$) was recorded in the rate of progressive motility, fast, medium, low, and static sperm percentages 10 min post thawing. However, combination of sucrose and trehalose increased significantly ($P<0.05$) the rate of sperm with rapid velocity, velocity straightness line and velocity average path which were 18.67%, 75.67 $\mu\text{m}/\text{sec}$ and 135.33 $\mu\text{m}/\text{sec}$, respectively. However, it reduced significantly ($P=0.03$)

velocity average path 45 min post thawing. No significant differences ($P>0.05$) were recorded between all parameters 45 min post thawing. The pregnancy rate didn't differ significantly, however, the highest rate was in ewes inseminated with semen containing sucrose and trehalose. There was no significant difference in lambing rate between the treatment groups, and it was the lowest was in both control and 100 mmol sucrose groups. From these results it may be concluded that although the addition of sucrose and trehalose to semen diluents increased kinetic parameters of sperms, however, did not increase significantly pregnancy and lambing rates.

No significant differences ($p>0.05$) were recorded in the mean number of small follicles on the ovaries of the ewes of all treatment groups 24 hours after the administration of the gonadotropins, however, the differences were differentiated after 48 hours and the largest number of follicles was recorded in the hMG5 group with 9.6 follicles and the lowest in the group hMG25 with 6.33 follicles. No large follicles were recorded at $\text{PGF}_{2\alpha}$ administration or 24 hours later in all treatment groups. Large follicles were only recorded in the ewes treated with high levels of hMG and rFSH (3.5 and 3.17 follicles respectively). The diameter of the ovulatory follicle didn't differ significantly ($p>0.05$) among the groups ($P<0.05$) except for that of the hMG15 group, in which the diameter of the ovulatory follicles was 5 mm. Follicular growth after 24 hours of eCG, hMG, or rFSH injection was quite similar in ewes of all groups and the differences between the groups did not reach the level of statistical significance ($p>0.05$) except for rFSH and hMG15 group ($p<0.05$) which had mean follicular growth ranged between 1.10 and 1.52 mm/day, respectively. The contrast was more significant ($p<0.05$) between some groups 48 hours after the injection of the gonadotropins, as the injection of eCG alone or in combination with hMG led to the highest follicular growth rate, and the average follicular growth was 1.95 and 2.23, respectively. The lowest follicular growth rate was in ewes treated with 15 IU of hMG (1.31 mm/day). No statistical differences ($P>0.05$) were recorded in the percentage of pregnancy and lambing rates. From the results, it may conclude that different gonadotropins can be used in combination with the ovulation Synchronization protocol without affecting the pregnancy rate.

All ewes exhibited synchronous estrus, and no statistical differences ($p>0.05$) were recorded between groups at its beginning or end. No statistical

differences were recorded ($p>0.05$) in urea, glucose or triglycerides concentration in pregnant and non-pregnant ewes, their concentrations fluctuated up and down around the physiological value of each. In addition, treatment with different gonadotropins did not affect the rate of pregnancy, lambing birth, urea or cholesterol of Awassi ewes.

It may be concluded from the current study that pregnancy rate is negatively related to the level of triglycerides, and the use of gonadotropins is safe and does not affect the metabolic rates of Awassi ewes.

Key words: Awassi rams, trehalose, sucrose, CASA, hMG, eCG, rFSH, Ovsynch, glucose, triglycerides.