صناعة السائل المنوي
Semen Processing

الدكتور محمد موسى
رئيس برنامج التلقيح الاصطناعي ونقل الأجنة
بالمركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة /أكساد/

التمديد Dilution:

وظائف البلازما المنوية:
- تسهل عملية القذف أو انصباب النطاف في الجهاز التناسلي الأنثوي.
- تنشط الخلايا المنوية بوساطة محتوياتها من الركائز الأساسية للطاقة.
- تحتوي على بعض المواد الكيميائية مثل: غليسيريلفوسفوريل كولين (GPC) الذي يؤثر على الجهاز التناسلي الأنثوي ويزيد من تقلصات عضلات الرحم.
-

تأثيرات عكسية على النطاف منها:
- تنشيط فعالية النطاف مما يؤدي إلى استهلاك طاقتها ونظامها الأنزيمي وضعف نشاطها.
- تعمل على سرعة استهلاك المواد الغذائية اللازمة للنطاف (نتيجة نشاطها) الأمر الذي يقود إلى الإقلال من حيوية النطاف وموتها بعد فترة وجيزة.
- استبدال هذا الوسط الطبيعي بوسط صناعي (ممدد أو مخفف) بحيث يمكن التغلب على المساوئ والإبقاء على فوائد هذا الوسط خارج الجسم لأطول فترة ممكنة.

الممددات: هي الأوساط التي تستعمل لزيادة حجم القذفة المنوية وحمايتها أو المحافظة على قدرته الاخصابية أثناء الحفظ لفترات طويلة.

الهدف من تمديد السائل المنوي
- زيادة حجم القذفة المنوية حتى يمكن توزيعها على عدد أكبر من الإناث.
- الحفاظ على قدرة الإخصاب للحيوان المنوي منذ الحصول عليه من الذكر وحتى إيداعه في الأنثى.
- إطالة فترة تخزين الحيوان المنوي.

خصائص ممدد السائل المنوي الجيد:

- يجب أن يكون الممدد متعادل التوتر مع السائل المنوي (أي أن يكون لديه التركيز الأيوني الحر نفسه)، مثال: 2.9 % سترات الصوديوم.
- قدرة الفصل أو الدرء يجب أن تكون مزودة (منع تبدّل الباهاء من خلال الحموض التعادلية الناتجة عن استقلاب الخلية المنوية)، مثال: المحاليل الدارئة متعادلة التوتر كمحلول سترات الصوديوم أو محلول التريس.
- يجب أن يحمي الممدد النطاف من صدمة البرد في أثناء التجميد. مثال: (الليبوبروتينات منخفضة الكثافة LDL الموجودة في صفار البيض أو الحليب).
- يجب أن تزود المواد المغذية الضرورية لاستقلاب النطاف، مثل بعض السكريات (الغلوكوز والفركتوز).
- يجب التحكم بالجراثيم المعدية من خلال إضافة الصادات الحيوية مثل: البنسلين والستربتومايسين.
- يجب أن تحمى النطاف من التضرر الناتج عن التبلور في أثناء التجميد والذوبان بإضافة واقيات من البرودة للممدّد مثل الغليسيرول.
- يجب أن يزود بمصدر من المواد المضادة للأكسدة لحماية الأنزيمات الخلوية.
- يجب أن يكون خالي من المواد السامّة والمنتجات الجرثومية أو العوامل المعدية الضارة بالنطاف والقناة التناسلية الأنثوية والعملية الإخصابية وكذلك انغراس وتطور البيوض المخصبة.
- يجب أن يكون رخيص الثمن وسهل التحضير.

الاحتياجات الأساسية للممدد الاصطناعي:

بشكل أساسي يجب أن يحتوي الممدد :

- محلولاً متعادلاً التوتر مكون من مواد ضعيفة أو عديمة التأين.
- محلولاً ملحياً متعادل التوتر.
- الواقيات من البرودة والصادات الحيوية.

المحاليل الضعيفة التأين أو غير المتأينة:

- مثل السكريات (غلوكوز، فركتوز، لاكتوز، سكروز). وعمل هذه المواد (شواردها سالبة) في الممدد هو حماية النطفة بشكل رئيسي وذلك من خلال ما يأتي:
  - تضعيف التيارات الكهربائية ضمن السائل المنوي وبذلك تقلل فرصة التراص أو التلزن Agglutination بين النطاف.
  - تحفظ السائل المنوي من التلزن الناتج عن الأكسدة.
  - حماية الأنزيمات الخلوية.
  - تثبيط عمل السبيرمولايزين Spermolysin (حالات النطاف).
  - تزيد من لزوجة الوسط.

المحاليل الملحية أو الدارئة:

- يجب أن يحتوى الممدد على محلول متعادل التوتر غير سمّي من الشوارد الصاعدة متعددة التكافؤ والشوارد الهابطة أحادية التكافؤ مثل 2.9 % سترات الصوديوم أو محلول التريس.

يمكن أن يلخص دور الأملاح بما يأتي :
- الأملاح قادرة على ربط الشوارد المعدنية الثقيلة الحرة الزائدة (Ca, Mg) التي تزيد من مقاومة الخلايا المنوية الغروانية حامية إياها من التضخم والانتفاخ.
- تشتيت كريات الدهن الموجودة في صفار البيض وبذلك يمكن رؤية النطاف بوضوح في أثناء الفحص المجهري.
- تزود القابلية الدارئة الجيدة.
- قادرة على ربط راصات أو ملزنات السائل المنوي.

واقيات البرودة :Cryoprotectors:
- العوامل الحامية من البرودة:
  - لا يمكن لخلايا الثدييات أن تعيش بدرجة حرارة أقل من 20 درجة مئوية.
  - تأثيراتها
    - تثبت جزئيات الماء وبالتالي تخفض نقطة التبلور
    - تخفض كمية الجليد
    - تعدل شكل البلورات الجليد
    - لها تأثيرات سلبية أحيانا
  - طبيعة العوامل الحامية من البرودة
    - الداخل خلوي: هي التي تدخل ضمن الخلية glycérol, éthylène glycol :
    - خارج خلوي : هي التي تبقى خارج الخلية بسبب كبر وزنها الجزيئي مثل جزئيات LDL المستخرجة من صفار البيض، السكروز.
    - عند مستوى الغشاء الخلوي: لا تدخل، فعلها فقط عند مستوي جدار الخلية (سايتوسكوليت)

الاحتياجات الإضافية لممدد السائل المنوي:

الصادات الحيوية Antibiotics: تستخدم بالتركيزات الآتية:
- البنسلين: 500 - 1000 وحدة دولية / مل من السائل الممدد.
- الاستربتومايسين: 500 - 1000 ميكروغرام / مل من السائل الممدد.

المحفزات (المقويات):

هي المواد التي تحوي مواد ذات فعالية فيزيولوجية تساعد في عملية الإخصاب من خلال التأثير في النطاف أو في القناة التناسلية للأنثى الملقحة. تضم هذه المواد ما يلي:

- الأنزيمات Enzymes : مثل (الميوسينيز، الكاتاليز). فالميوسينيز يساعد على تقليل لزوجة المواد المخاطية الموجودة في عنق الرحم وتسهيل حركة النطاف ودخولها إلى الرحم.

- الهرمونات Hormones: مثل الأوكسيتوسين Oxytocin الذي يساعد على تقلص عضلات الرحم بالجهة المعاكسة ويعمل على امتصاص السائل المنوي إلى داخل القناة التناسلية الأنثوية.

- المكونات المنشطة لنهايات الأعصاب Neurotropic prepartions: مثل الكاربوكولين، وهذه المواد تساعد على تقلص عضلات الرحم بعد إدخال السائل المنوي في الأنثى.

- الفيتامينات Vitamines: مثل فيتامين ب^{1} + ب^{12} وهذه تساعد على تنشيط فعالية النطاف.

- لماذا نضيف الممدد؟

- تعزيز استمرارية حياة الحيوانات المنوية خارج الكائن الحي.
- يعزّز أيضاً من استمراريّة الحياة الحيوانات المنوية من الحيوانات ذوات الخصوبة المنخفضة.
- إضافة الصادات الحيوية يقلل من خطر التلوث الجرثومي و الأخطار المتعلقة بانتقال العوامل الممرضة.
- يحقق الهدف بزيادة عدد الإناث الملقّحة بكل قذفة.

يوجد محاليل التمديد الجاهزة في الأسواق، بالإضافة يجب توفر مواد لتحضير محاليل التمديد محليا.
بعض محاليل التمديد الجاهزة مثل الاندروميد و التريلاديل.

نوع الممدد	ممدد سترات الصوديوم		AndroMed	Triladyl®	
المكونات الأساسية	صفار البيض	%20	محلول تجاري جاهز	صفار البيض	%20
	سترات الصوديوم	3.52غ		التريس	2,42 غ
	غليسيرول	%6.5		غليسيرول	%4.6
	غلوكوز	194ملغ		الفركتوز	1,00 غ
	المضادات الحيوية	50000 وحدة دولية بنسلين، و1000 ميكروغرام ستربتومايسين		حمض الستريك	1,48 غ
				المضادات الحيوية	25 ملغ من الجنتامايسين و 50000 وحدة دولية من البنسلين

حفظ السائل المنوي

- الحفظ بالتبريد عند الدرجة (2 - 5°م) (على المدى القصير)
- حفظ السائل المنوي بالتجميد (على المدى الطويل) :
- الموازنة أو التأقلم Equilibration: فترة الموازنة أو التأقلم هي الفترة التي يجب أن تقضيها النطاف على اتصال مع الغليسرول عند الدرجة 5° م لمدة 2.5 ساعة كفترة موازنة أو تأقلم.

- التحديد أو التعريف Identification

التمديد والحفظ على المدى القصير بصورته السائلة

- يمكن استخدام السائل المنوي غير الممدد والمحفوظ على درجة حرارة الغرفة خلال ساعتين من جمعه.
- يمكن حفظ السائل المنوي الممدد بدرجة حرارة الثلاجة (+ 5) لمدة أسبوع إلا أن معدل الخصوبة ينخفض تدريجيا ويكون ملحوظا بعد اليوم الرابع.
- كلما انخفضت درجة الحرارة حدثت تغيرات للحيوان المنوي مثل انكماش السيتوبلازم لذا يجب أن يتم خفض الحرارة ببطء.

❖ **ممدد صفار البيض:**

يستخدم صفار البيض الكامل مع سترات الصوديوم كممدد للسائل المنوي. تتراوح كمية صفار البيض 20 % من إجمالي الخليط.

❖ **مميزات صفار البيض:**

❖ يحتوي جزئيات الـ LDL (Low Density Lipoproteins) الليبوبروتينات منخفضة الكثافة المسؤولة عن حماية النطاف من صدمة البرد

❖ تحيط جزئيات LDL بالغشاء البلازمي للنطف وتؤمن حمايته من صدمة البرد، وتشكل جزيئاتها مادة هلامية gel تغلف النطفة أثناء عمليتي التجميد والإذابة.

❖ تفسير آلية عمل LDL من خلال قدرتها على التفاعل بشكل سريع ونوعي مع بروتينات البلازما المنوية (BSP-proteins) فتشكل مُعقد LDL-BSP proteins يكون ثابتاً حتى بعد إذابة التجميد.

❖ **سلبيات صفار البيض:**

❖ يحتوي علىHDL له اثر سلبي على النطاف

❖ وجود الحبيبات الدهنية بالإضافة إلى الليفتين.

إعداد ممدد صفار البيض بالسترات:

❖ يجهز بيض طازج من دجاج سليم بغسل البيض جيدا بالماء ثم بالكحول الايثيلي 70 % ويجفف.

❖ تكسر البيضة عند منتصفها ثم يصفى زلال البيض ويحجز الصفار.

❖ ينقل الصفار إلى ورق ترشيح ويدور على عدة مرات على أوراق ترشيح بهدف التخلص من الزلال.

❖ يحضر محلول سترات الصوديوم طازجا بإذابة 2.9 غم سترات الصوديوم لكل 100 مل من الماء المقطر.

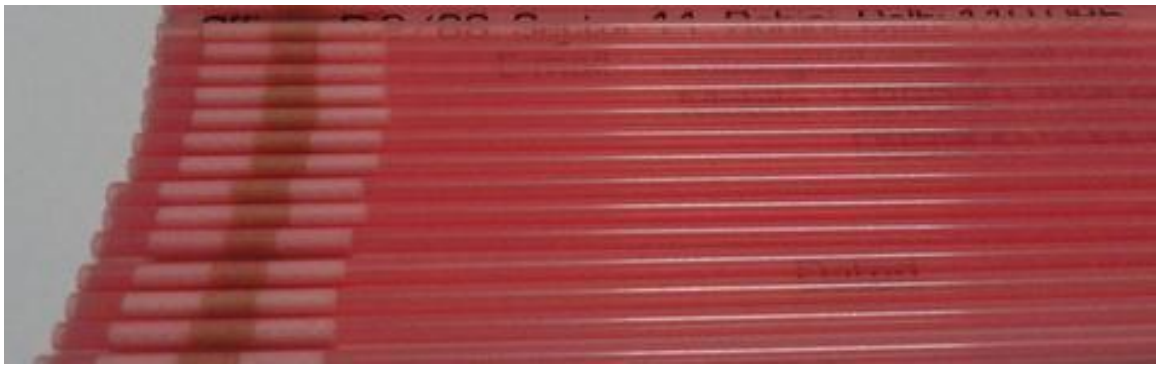
❖ يوضع كل من الصفار وسترات الصوديوم في حمام مائي عند 20 - 25 درجة مئوية.

معدل التمديد:

❖ معدل التمديد = تركيز الحيوانات المنوية/مل x نسبة النطاف الحية/عدد النطاف في جرعة التلقيح

التمديد والحفظ في القشات:

- **القشات:** عبارة عن أنابيب بلاستيكية رقيقة الجدار ومختلفة الأحجام (0.25 - 0.5 مل). يحتوي احد أطرافها على سدادة مزدوجة من القطن بينهما مسحوق كلوريد البولي فينيل، وهذه السدادة تسمح بشفط السائل المنوي.
- يتم إعداد ممدد صفار البيض بالسترات مع إضافة المضادات الحيوية.
- يحسب معدل التمديد كما سبق مع الأخذ في الاعتبار أن عدد النطاف المطلوبة لا تقل عن 20 مليون في السائل المنوي المجمد.



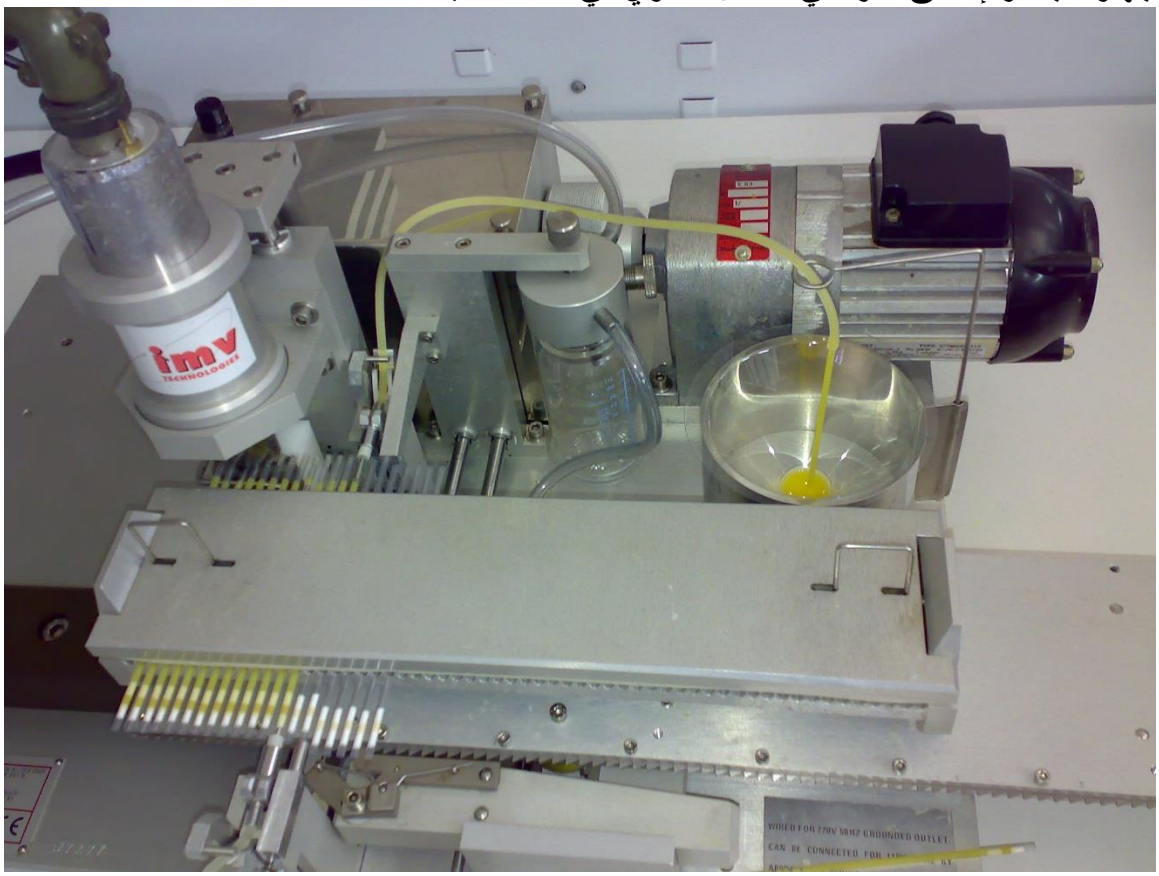
قشات بلاستيكية 0.5 مل



التمديد وتجهيز القشات للحفظ بالتجميد:

- يترك السائل المنوي كامل التمديد في الثلاجة بدرجة 5 مئوية لإتمام عملية التوازن وذلك لمدة ساعتين.
- تثبت القشات الفارغة في حامل أو مشط خاص لتعبئة السائل المنوي الممدد داخل القشات أليا.
- عند وصول السائل المنوي لسدادة القطن الداخلية وابتلالها هي ومسحوق البولي فينيل يتجمد مسحوق البولي فينيل مكونا سدادة قوية بين طبقتي القطن.
- يسد الطرف الحر من القشات بغمسها في مسحوق بولي فينيل أو بالكتم الحراري.

جهاز تعبئة والإغلاق الفرنسي للسائل المنوي في القشات أليا



التمديد والحفظ على المدى الطويل بالتجميد:

حفظ السائل المنوي (Preservation of semen):

وهي عملية حفظ الحيوان المنوي خارج الجسم عدة ساعات أو أيام أو سنين واستعماله في عملية التلقيح الاصطناعي على أن يحفظ الحيوان المنوي بكامل حيويته عند استعماله. وتقوم فكرة الحفظ على تثبيط حركة الحيوان المنوي وعملياته الاستقلابية محافظةً عليه من الإنهاك والهلاك وذلك من خلال خفض درجة حرارة الحيوانات المنوية. ونستطيع تلخيص فوائد خفض الحرارة في:

- تنخفض حركية الحيوانات المنوية كلما نقصت درجة حرارتها وتبلغ ذروة انخفاض حركتها عند

الدرجة -4,-9˚م فعند هذه الدرجة تقف نمو جميع الجراثيم الضارة بالحيوانات المنوية.
- تقف حركة الحيوانات المنوية عند الدرجة /5/ ولكن تستطيع الجراثيم المولدة للصديد أن تعيش عند هذه الدرجة لمدة 2-3 أيام (الثيران) و1-2 يوم (كباش+خنازير) و(1) يوم عند (الحصان).
- خفض درجة الحرارة حتى (0) تطبق بشكل تدريجي لتفادي صدمة البرد.

وقد أجريت تجارب عديدة للوصول إلى أنسب ممدد صالح لحفظ السائل المنوي، وقد أثبتت الدراسات أن الممدد (المخفف) المناسب لحفظ السائل المنوي لابد أن يتوفر به الآتي:

1. المقدرة التنظيمية العالية على حفظ درجة الحموضة.
2. تحتوى على مواد تحمى الحيوان المنوي من أضرار التبريد مثل صفار البيض.
3. أن تحتوى على مصدر مناسب من الطاقة.
4. أن يكون الضغط الأسموزى مناسباً (300 - 375)
5. أن تكون درجة الحموضة قريبة من التعادل.
6. أن يحتوى على المضاد الحيوي المناسب.

أساسيات حفظ السائل المنوي في صورة مجمدة:

- في حالات حفظ السائل المنوي على درجة حرارة فوق 7 درجات مئوية فان الحيوان المنوي يكون سريع الحركة وبالتالي يفقد حيويته ويصبح عمره قصيرا، وكلما زادت درجة الحرارة كلما قصر عمر الحيوان المنوي.
- كذلك فان الحفظ بدرجة حرارة فوق درجة التجميد فان التمثيل الغذائي يستمر ولكن بمعدل منخفض.
- تعريض الحيوان المنوي لدرجة حرارة منخفضة اقل من الصفر بطريق فجائية يتسبب في تغيرات غير قابلة للاسترجاع تنتهي بتلف وموت الحيوان المنوي وهو ما يعرف بصدمة البرودة.
- يتم التغلب على تأثير صدمة البرودة باستخدام معدل تبريد متدرج وبواقي برودة مناسب (مادة مضادة للتجميد) مثل الغلسيرول حفظ السائل المنوي عند درجة – 196 مئوية على النيتروجين السائل.

دور الغلسيرول في تجميد السائل المنوي:

- إضافة الغلسيرول بتركيز 7 % يسبب خفض درجة تجميد السائل المنوي.
- ينفذ الغلسيرول بسهولة عبر جدار النطف ويقوم بحمايتها أثناء التجميد.
- له نشاط ايضي.
- له دور فعال كمضاد للجراثيم.

طرق حفظ السائل المنوي :

حفظ السائل المنوي لفترة قصيرة بالتبريد:

عندما تكون درجة حرارة الجو الخارجي أكثر من 20م يمكن حفظ السائل المنوي في ترمس مملوء إلى نصفه بالجليد ويوضع فوق سطح الجليد طبقة من القطن سماكتها 3-4 سم وفوق هذه الطبقة

ترتب الأنابيب. أما في الجو البارد يوضع السائل المنوي في ترمس لا يحتوي على جليد. وفي حال انخفاض درجة حرارة الجو الخارجي إلى الصفر المئوية يجب حماية السائل المنوي من التجمد وذلك بلف الأوعية بالقطن أو غيره من المواد العازلة.

ولقد لوحظ نتيجة التجارب العلمية والعملية أن الحيوانات المنوية المحفوظة بهذه الطريقة يمكن أن تحتفظ بقدرتها الإخصابية لمدة حوالي 3 أيام وعند زيادة المدة عن ذلك تنخفض نسبة الحيوانات المنوية الحية عن ذلك تنخفض نسبة الحيوانات المنوية الحية وبالتالي نسبة الإخصاب وإذا بقيت لمدة أكثر من ستة أيام فلا فائدة ترجى من استخدام هذا السائل المنوي. حفظ السائل المنوي على درجة 4 مئوية باعتبار أن هذه الدرجة من الحرارة كافية لتخفيض معدل العمليات الحيوية في الحيوانات المنوية إلى المستوى المطلوب. ولقد أثبت العديد من الباحثين أن انخفاض درجة الحرارة إلى الصفر المئوي يؤدي إلى تخفيض معدل الأكسدة والتحلل اللاهوائي بحدود 20-25 مرة بالمقارنة مما هو عليه في درجة حرارة الجسم.

وعند إجراء عملية تبريد السائل المنوي بهذه الطريقة لابد من ملاحظة مما يلي :
تحاشي تعرض الحيوانات المنوية لصدمة البرد وذلك بإجراء عملية التبريد وبصورة تدريجية فكلما كانت عملية التبريد بطيئة كلما كانت فرصة التعرض لصدمة البرد أقل. ولكن من ناحية ثانية لا يمكن تبريد السائل المنوي لكل من الكبش والثور ببطء شديد لأن ذلك يؤدي إلى تراكم حمض اللبن ذي التأثير الضار على الحيوانات المنوية. ونتيجة لذلك لابد من اختيار سرعة التبريد المناسبة التي تؤمن تجنب خطر الصدمة الباردة من ناحية وعدم تراكم حمض اللبن من ناحية ثانية. ولتحقيق ذلك ينصح العديد من العلماء بإجراء عملية التبريد بسرعة وبذلك لا تستطيع الحيوانات المنوية إنتاج كميات كبيرة من حمض اللبن وغيرها من نواتج الإستقلاب وكلما إقتربنا من درجة صفر مئوية يتم التبريد ببطء حتى الوصول إلى الدرجة المطلوبة. وهناك طريقة أخرى للتقليل من تأثير صدمة البرد تتلخص بإضافة مواد واقية من البرودة كصفار البيض إما لوحده أو بعد خلطه بسترات أو فوسفات الصوديوم أو الغلوكوز حتى الوصول إلى الدرجة المطلوبة.

وتجدر الإشارة إلى أنه لا يمكن تجنب صدمة البرد بالكامل بإضافة صفار البيض لذلك يجب دائما ملاحظة التدريج في عملية التبريد.

أما فيما يتعلق بدرجة الحرارة المثالية لحفظ السائل المنوي فهناك اختلاف واضح بين العلماء في هذه المسألة. ولقد اعتبر حتى فترة قريبة أن درجة الحرارة الضرورية لحفظ السائل المنوي لجميع الحيوانات الثديية هي درجة صفر مئوية ولكن في الآونة الأخيرة اتبع نظام حفظ السائل المنوي على درجة 4-5 م. ولقد أثبتت الأبحاث أن حفظ السائل المنوي للكبش على درجة 2م أدى إلى إطالة حياة الحيوانات المنوية والمحافظة على قدرتها الإخصابية بالمقارنة مع السائل المنوي المحفوظ على درجة حرارة صفر مئوية.

هذا وتتلخص خطوات حفظ السائل المنوي للكبش والثور على درجة حرارة 2-4م بالنحو التالي:
إجراء عملية تقييم الكثافة ونشاط الحيوانات المنوية التي يجب أن تتم خلال فترة قصيرة لا تتجاوز 5 دقائق وذلك لأن حمض اللبن يتراكم بسرعة خاصة في حال ارتفاع تركيز الحيوانات المنوية في السائل المنوي. وبعد الانتهاء من عملية التقييم يضاف الممدد التي يجب أن تكون درجة حرارته 30-35م للسائل المنوي للثور والكبش 25-30م.

وبعد إضافة الممدد يوضع السائل في درجة حرارة الغرفة (18-20) م لمدة 20-30 دقيقة. إن هذه المدة تزيد قدرة الحيوانات المنوية على تحمل البرودة كما تساعد في ظهور الخاصية الدفاعية لصفار البيض. وبعد الانتهاء من هذه الخطوات يعبأ السائل المنوي في أمبولات بسعة معينة وتجري عليها عملية التبريد التدريجي حتى درجة 2-4 م خلال 3-4 ساعات وبعد ذلك تحفظ على هذه الدرجة في براد عادي أو ترمس.

ويجب استخدام السائل المنوي المحفوظ بهذه الطريقة خلال أيام معدودة حيث وجد أن القدرة الإخصابية للحيوانات المنوية للثور تبقى مرتفعة لمدة 2-3 أيام وأحياناً 4 أيام أما الحيوانات المنوية للكبش فتحافظ على قدرتها الإخصابية خلال 24 ساعة وأحياناً 36 ساعة. وقبل استخدام السائل المنوي للتلقيح لابد من إجراء عملية اختيار للقدرة الحيوية للحيوانات المنوية عند درجة حرارة 38-40م.

حفظ السائل المنوي لفترة طويلة عن طريق التجميد :

لابد من التنويه أن تبريد السائل المنوي إلى درجة حرارة الصفر المئوية أو أكثر من ذلك بقليل (2-4) م لا يسمح بحفظه لأكثر من أيام قليلة جداً لا تتجاوز 2-4 أيام وعلى الرغم من أن الحيوانات المنوية يمكن أن تحتفظ بقدرتها الحركية في هذه الدرجات من الحرارة لمدة حوالي أسبوعين إلا أن قدرتها الإخصابية تنخفض بصورة واضحة بعد 2-3 أيام.

كذلك فإن درجات الحرارة القريبة من الصفر تؤدي إلى تخفيض معدل الإخصاب الحيوانات المنوية إلا أنها لا تسبب توقيفه لذلك تتراكم مخلفات الإستقلاب الضارة بسرعة وتبدأ عملية تحلل في الجزء الأمامي لرأس الحيوان المنوي (الأكرموسوم).

بالإضافة إلى ما ذكر يرافق عملية حفظ السائل المنوي لفترة قصيرة صعوبات جمة خاصة فيما يتعلق بتنظيم عملية توزيعه وتخزينه لوقت الحاجة.

أما الحفظ بالتجميد فيكون لمدة طويلة قد تصل إلى عشر سنوات. ولقد انتشرت هذه الطريقة في الوقت الحاضر على نطاق واسع لأنها تؤمن حفظ السائل المنوي وتوزيعه بشكل منظم خلال العام كما تمكن من استخدامه في عمليات التحسين الوراثي في مناطق مختلفة من العالم.

هناك طريقتان يتم بهما حفظ السائل المنوي بالتجميد :

- التجميد باستخدام ثاني أكسيد الكربون الجاف (79 -) م .
- التجميد باستخدام النيتروجين السائل (196 -) م .

والتجميد باستخدام النيتروجين السائل أكثر شيوعاً طريقة تجميد السائل المنوي باستخدام النيتروجين السائل: من المعروف أن مخفف السائل المنوي المستخدم في حالة حفظ السائل المنوي بالتجميد يحتوى على مواد تخفف من التأثير الضار لعملية التجميد، ومن هذه المواد الجليسرول. وتختلف طرق التجميد حسب الطريقة التي يضاف بها الجليسرول، فقد يضاف إلى المخفف الذي يستخدم في عمليتي التجفيف والتجميد، وهذه الطريقة يطلق عليها خطوة واحدة، وفي حالة التجميد باستخدام مخفف مكون من جزأين، الجزء الأول لا يحتوى على الجليسرول، ويتم تخفيف السائل المنوي على درجة حرارة الغرفة، ثم يتم حفظه في الثلاجة حتى يصل إلى درجة 5 ْم، والمخفف الذي يحتوى

على الجليسرول يضاف على درجة 5˚ م بالتدريج، وبعد الانتهاء من إضافة المخفف الذي يحتوى على الجليسرول يترك السائل المنوي المخفف في الثلاجة لمدة ساعتين ويطلق على هذه الفترة يطلق عليها فترة التوازن أوالتأقلم، ثم يتم تعبئة القشات البلاستيكية Straws وتقفل باستخدام مادة البولى فينيل الكحولية، ثم توضع على ارتفاع 5 سم من سطح النيتروجين السائل لمدة 8 دقائق، ثم تحفظ في النيتروجين على درجة 196 - م، وعند الاستعمال يتم إذابة القشات في ماء على درجة 37˚ م لمدة دقيقة.

وقت التأقلم Equilibrating Time:

هو الوقت الذي يجب أن يقضيه الحيوان المنوي في درجة حرارة / 5 /˚م لكي يكون جاهزاً في الدخول لعملية التجميد وقدرت هذه المدة بـ / 2.5-4 / ساعات. وتجري هذه العملية بعد تمديده وإضافة الجليسرول إليه.

- قديما كان يقسم ممدد السائل المنوي (صفار البيض) إلى قسمين قسم يضاف إليه الجليسرول بنسبة 14% والقسم الآخر تضاف إليه المضادات الحيوية (الجليسرول يؤثر في المضادات الحيوية) ويوضع في القسم الثاني السائل المنوي ويبرد عند درجة / 5 /˚م.
- نضيف القسم الأول إلى القسم الثاني على 3-4 مراحل بين كل مرحلة وأخرى / 20 / دقيقة وعلى هذا الأساس تصبح نسبة الجليسرول 7 % ونرج الناتج برفق.
- توزع هذه الكمية على أمبولات سعة كل فرع / 1 سم3 / ثم تسد هذه الأمبولات الزجاجية على أن لا تصل الحرارة الناتجة من عملية الإغلاق إلى الحيوانات المنوية
- توضع هذه الأمبولات في 95% من الكحول الإيثيلي عند الدرجة / 5˚م / ثم تخفض هذه الحرارة / 1˚م / كل دقيقة حتى تصل الحرارة /-15/˚م.
- ثم تخفض الحرارة بسرعة إلى /-79/ بإضافة الثلج الجاف بسرعة إلى الكحول وهذه العملية تحتاج إلى 4/1 ساعة.

التجميد باستخدام النيتروجين السائل (196 -) م :

يمكن أن نحفظ السائل المنوي المجمد عند درجة -196 (في السائل الآزوتي) باستخدام نظام التجميد الآلي والمؤلف من (حاسب- منظم آلي- خزان سائل أزوتي مضغوط- حجرة تجميد).

- ❖ يتم خفض حرارة قشات السائل المنوي الممدد من 4˚م إلى– 140˚م خلال 4 دقائق في بخار السائل الآزوتي بما يدعى التجميد الأولي.
- ❖ ثم تنقل القشات المجمدة أولياً إلى وعاء عازل من الستريوبور مملوء بالسائل الآزوتي لتتم فيه عملية التجميد النهائي على حرارة – 196˚م.
- ❖ تعبأ القشات المجمدة في غوبلات بلاستيكية خاصة ضمن السائل الآزوتي.
- ❖ نقل القشات المجمدة إلى الحامل المخصص من خزانات السائل الآزوتي للتخزين.

ملاحظة: عند إجراء عملية تجميد السائل المنوي:

- يجب تفادى المنطقة الحرجة (أقل من الصفر حتى - 21 م) وهي التي يتكون فيها البللورات الثلجية

داخل الخلية المنوية، وذلك يعمل تجميد سريع جداً لتخطى تلك المنطقة في أقل وقت ممكن، حيث إن تكوين البللورات الثلجية داخل الخلية - وخاصة في منطقة الذيل - يؤدى إلى تغيير في ترتيب الألياف بتلك المنطقة. كذلك يجب أن تكون الإسالة سريعة .

- يراعى أيضاً إضافة الجليسرول على درجة منخفضة لتقليل تأثير سميته على الحيوان المنوي.

طريقة القشات :

يعبئ السائل المنوي بعد تمديده بالقشات البلاستيكية قياس (0.25 مل أو0.5 مل) وتطبع عليها بيانات خاصة لكل ثور على حدى ثم يجري تجميدها عند – 140 درجة مئوية بتعريضها لبخار النيتروجين ثم تغمس القشات في النيتروجين السائل (- 196 درجة مئوية) وتبقى مغمورة باستمرار إلى حين الحاجة لها.



الشكل (16): قشة مملوءة بالسائل المنوي للثيران.



الشكل (17): خزان سائل أزوتي يحتوي على قشات السائل المنوي المجمد.

إزالة التجميد:
توضع القشات بعد سحبها من ترمس التلقيح مباشرة في حمام مائي بدرجة حرارة 37°م ويختلف الوقت اللازم لإذابة القشة باختلاف حجمها غالبا لمدة 30 ثانية ثم تجفف القشة من الخارج وتوضع في مسدس التلقيح ثم يوضع مسدس التلقيح في القسطرة البلاستيكية وبذلك تكون القشة جاهزة لإيداعها في عنق الرحم.

الأضرار المترتبة عن عملية التجميد:
- عند التجميد فإن انخفاض درجة الحرارة البطئ يؤدي إلى تجميد الماء وتكوين بلورات ثلج داخل وخارج الخلية وزيادة تركيز ما تبقي من السوائل خارج الخلية مؤديا إلى زيادة الضغط الاوزموزي خارج الخلية وخروج الماء من الخلية وبالتالي جفاف الخلية وهذا يسمي تأثير المحلول.
- أما إذا تم الانخفاض سريعا، لتفادي تأثير المحلول، فهناك تأثير آخر وهو تكوين بلورات الثلج داخل الخلية مما يؤدي إلى تحطيم جدارها وموتها.
- من ذلك يتضح أن التحدي الحقيقي للحيوان المنوي هو مدى قدرته على عبور درجة الحرارة بين - 10 و- 50 مئوية دون التعرض لمخاطر المحلول أو تكون الثلج داخل الخلية.
- لذلك فان زيادة معدل التبريد مع وجود مادة واقية وقصر الوقت مهم لتقليل تعرض الحيوان المنوي لأخطار هذه المرحلة.

ميزات السائل المنوي المجمد:
1- إمكانية استعماله لثور مجروح أو مكسور على مدار السنة.

2- إمكانية انتخاب الطلائق الممتازة من أعداد كبيرة من الثيران.
3- سهولة نقل السائل المنوي المجمد وخفض تكاليف تصنيعه إذا ما قورن بنقل الحيوان نفسه.
4- يمكن تخزين الحيوانات المنوية لمدة شهور أو عدة سنين عند درجة -79 باستعمال الثلج الجاف والكحول أو عند الدرجة -196 باستعمال السائل الآزوتي. وتشكيل بنك وراثي من السائل المنوي.



بنك وراثي للسائل المنوي.

مساوئ السائل المنوي المجمد :

1- إن تكلفة صنع الأمبولات والتجميد وأدوات الحفظ والتخزين غالية.
2- نفوق أعداد كبيرة من الحيوانات المنوية نحو 50 % أثناء عملية التجميد لذا يجب زيادة العدد لتفادي النقص.
3- إمكانية نشر كثير من الأمراض الفيروسية والجرثومية والوراثية وعلى مساحات واسعة.
4- بانتشار عملية التلقيح الاصطناعي بالسائل المنوي المجمد نقضي على أعداد كبيرة من الثيران وبالتالي تضيق عملية الانتخاب الأساسي التي تتم بين الثيران.

مراقبة الخزانات وصيانتها:

أ- يجب أن يكون مستوى السائل الآزوتي دائماً مغطي لقشات السائل المنوي، وخاصة عند التخزين إذ يجب أن يكون السائل الآزوتي أعلى من حرف أعلى علبة القشات.
ب- يجب أن تكون جميع الأوعية المحتوية على القشات مراقبة يومية من ناحية السائل الآزوتي وخاصة في أيام العطل والأعياد.
ج- يجب أن يكون في كل مركز فرعي خزان واحد من كل نوع على الأقل كاحتياط، أي خزان واحد لكل ثمانية خزانات قيد الاستعمال أو 2-9.
د- يجب أن يحفظ السائل المنوي لكل ثور في خزان أو طبقة خاصة بالثور في بنك السائل

المنوي، وهذه مهمة خاصة من أجل الثيران التي ظهرت نتيجة قيمتها التربوية أو تلك الثيران التي تستعمل مبكراً أول بأول، وعندما يتم إعادة تنظيمها يكون ذلك أسهل في التوزيع وهذا واضح أكثر ويعطي فائدة أكثر، عند وجود شكوى ضد الرعاية التناسلية.

ه- يجب أن تكون هناك خزانات مخصصة لكل منطقة على حدة أثناء التوزيع والنقل.

و- يجب أن توضع جميع أوعية السائل المنوي المجمد وما يختص بأوعية السائل الآزوتي في مكان جيد التهوية، ويجب أن تكون هناك مروحة (مكيف هوائي) عند وجود أكثر من خمسة أوعية للسائل المنوي المجمد أو خمس أوعية للسائل الآزوتي في غرفة واحدة وأنه لا يسمح بتخزين أكثر من وعاء يحتوي على 50-100 ليتر من السائل الآزوتي في مخبر السائل المنوي.

ز- تفرغ وتنظف وتطهر الأوعية التي سعتها أكثر من خمسين ليتر كل سنتين من العمل على الأكثر.

ح- تؤخذ بعين الاعتبار النقاط الآتية قبل الاستعمال الأول وعند إعادة استعمال علب القشات:

- تنظف علب القشات بمنظف ملائم.
- تعقم بعناية بمعقم ملائم (1/هيلاميد لمدة خمسة عشرة دقيقة).
- تشطف بعناية بواسطة الماء المقطر.
- تجفف بواسطة الهواء الطلق أو في فرن ذو حرارة منخفضة (20- 30درجة مئوية).

ط- يجب التأكد دائماً على أن السائل الآزوتي يغطي القشات، يمكن وضع القشات في حوض التصنيع عند تنظيف صناديق القشات المحتوية على القشات ويمكن إجراء فحص جرثومي في هذه العلب.