استمارة مستخلصات رسائل واطاريح الماجستير والدكتوراه في جامعة البصرة

الكلية: الطب البيطري **اسم الطالب: خيري غركان عويد**

القسم: الفسلجة البيطرية **اسم المشرف : عبد الرزاق نعيم خضير: طاهر عبد الحسين فهد**

التخصص: فسلجة بيطرية **الشهادة: الماجستير**

عنوان الرسالة أو الأطروحة

التنشيط خارج الجسم لحيامن المعز المحلي العراقي المجمدة المذابة والاخصاب باستخدام بعض الاضافات لأوساط معينة

ملخص الرسالة او الاطروحة

الخلاصة

ان الموت غير المتوقع ممكن ان ينهي الحياة التناسلية للذكر ذو الصفات الصفات الوراثية عالية الكفاءة ويمنعها من التوارث او الانتقال للأجيال مالم يتم التفكير في ابتكار طرق حديثة لحفظ المادة الوراثية الذكرية (الحيامن) من التلف اثر هذا الموت المفاجئ. اجريت هذه التجربة للفترة من شباط 2015 ولغاية شباط 2016 وتضمنت الامور التالية:

1- جمع السائل المنوي من خمسة ذكور محلي أسود بعمر 3- 4 سنوات ومتوسط وزن 55 كجم بواسطة المهبل الاصطناعي وتم تقييم السائل المنوي (الرقم الهيدروجيني، تركيز الحيوانات المنوية، نسبة الحركة الجماعية في البلازما المنوية).قسمت عينات السائل المنوي الى ستة اجزاء وغسلت مع دارئ الفوسفات الفسلجي (1: 9) وذلك بتدويرها بجهاز الطرد ALT و ASTوالفردية، والحيوية والتشوهات، وكذلك تقدير مستوى) ، حليب CM)، حليب الإبل (TB)، تريس (EYالمركزي بمعدل 1200 دورة لمدة 10 دقيقة في درجة حرارة الغرفة وأزيلت البلازما المنوية. بعد ذلك، تم تخفيف العينات بستة مخففات مختلفة: صفار البيض 10٪ ( ).GAJ) ,عصير التفاح الأخضر (BPJ)، عصير بنجر السكر (GMالماعز (

قسمت المخففات المنوية إلى جزئين، احدهما يحتوي على الكليسيرول والآخر بدون الكليسيرول. ثم اضيف الجزء الخالي من الكليسيرول إلى الحيامن ليتم نقلها إلى الثلاجة (5 إلى 6 درجات مئوية)بعد ان وضعت في وعاء قياس 250 مل يحتوي على 150 مل ماء درجة حرارته 25 م°, بعد 1.5 ساعة وعندما وصلت درجة حرارة الماء في الوعاء 5 إلى 6 م° ، تم إضافة الجزء الحاوي على الكليسيرول إلى الحيامن في ثلاث فترات بمعدل 10 دقيقة للحصول على تركيز نهائي 200 × 10^6 حيمن / مل. تم تقييم السائل المنوي المخفف كما حصل مع المني الطازج. تم تعبئة السائل المنوي المخفف في انابيب إبندروف 1 مل ووضعت على بخار النيتروجين لمدة 10 دقيقة، 4 سم فوق مستوى النيتروجين، ثم غمرت في النيتروجين السائل. تم تجميد عينات الحيوانات المنوية إلى .بعد ثلاثة اشهر من التجميد اذيبت العينات في درجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق ونقلت . ALT و ASTإلى حاضنة ثاني اوكسيد الكاربون 39 م° لمدة 20 دقيقة واخذت كمية صغيرة (0.1 مل) من كل عينة لتقييم الحركة المئوية، الحركة التقدمية، الحيوانات المنوية الحية، الحيوانات المنوية طبيعية و مستوى) النسب المئوية من إجمالي الحركة الكلية والتقدمية مقارنة مع مخففات حليب الماعز والجمال وعصيري 0.05> Pوتبين من النتائج في كل المراحل، ان الحيامن المخففة بمخففي مح البيض 10% والترس اظهرت أعلى (البنجر والتفاح الاخضر، كما تبين أن هناك تشابه كبير في معايير تقييم الحيامن بين مخففي حليب الماعز والجمال بينما كان مخفف التفاح الاخضر والبنجر اقل المخففات معنوية في جميع المعايير.

) لتحديد تأثير الاوساط الزرعية على تنشيط مني المعز المحلي المجمد ، تم فصل الحيامن عن طريق وضع عينة السائل المنوي لكل انبوبة TCM-199 و SOF و 2DMEM- استخدمت ثلاث اوساط زرعية (ابندروفت مجمدة تحت 1.3 مل من الوسط الزرعي والسماح للحيوانات المنوية للسباحة بوضعها في حاضنة ثاني اوكسيد الكاربون لمدة 1 ساعة في 39 م° وبزاوية 45 درجة. بعد الحضانة سحب 1 مل من أعلى الانبوبة ووضع في انبوبة اختبار وبجهاز الطرد المركزي 300 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق وقد استخدمت تقنية الطبقة البسيطة قدرة الحيوانات المنوية المتحركة للهجرة (السباحة للأعلى) خلال الوسط.أزيل الجزء الطافي وتم مزج الراسب مع 1 مل من الوسط ليتم بعده تقييم الحيامن.

اظهر أعلى نسبة تنشيط للحيامن بغض النظر عن نوع المخفف المستخدم.TCM-199أوضحت النتائج انخفاض حاد في تركيز الحيامن بعد التنشيط وأن وسط

-3TCM- تنشيط مني المعز المحلي المجمد المذاب باستخدام بعض المواد الكيميائية (هيبارين، الكافيين، بينتوكسيفيلين وخلاصة عرق السوس). تم حضن عينات المني لجميع المخففات المستخدمة في التجربة في الوسط ومعاملتها بالمواد الكيميائية المذكورة أعلاه باستخدام حاضنة ثاني اوكسيد الكاربون وفصلت الحيامن بطريقة الطباقة البسيطة (السباحة للاعلى). تبين من النتائج المتعلقة بمخفف صفار البيض ان الكافيين اظهر زيادة 199 0.65 و 70 ± 2.82 على ± 33.2 0.96 و 78 ± 2.54 على التوالي) مقارنة بالسيطرة (33.0 ± 0.70 و 70 ± 2.98 على التوالي) و عرق السوس (±) في تركيز الحيامن والحركة الكلية (0.0535.6>pمعنوية ( ) نسبة حركة 0.05> Pالتوالي) وتفوق غيرمعنوي مقارنة بالهيبارين(34.0 ± 0.79 و 75 ± 1.84 على التوالي) و البنتوكسي فيلين (34.4 ± 0.76 و 75 ± 3.13 على التوالي). أدت المعاملة بالكافيين إلى أعلى (2.12 و 52 ± 1.14 و 50 ± 1.58 على التوالي) وتفوق غير معنوي مع الهيبارين (55 ± 1.84)، لا يوجد فرق كبير بين المعاملات في ± تقدمية (58 ± 2.23) مقارنة بالسيطرة والبنتوكسيفيلين و عرق السوس (46) في النسبة المئوية 0.05> Pنسبة التشوهات. هناك تشابه كبير في النتائج بين مخفف مح البيض مع مخففي حليب الماعز والجمال في اغلب المعايير اما بالنسبة لمخفف الترس فقد تفوقت مجموعة البنتوكسي فيلين معنويا (مقارنة بمجموعتي السيطرة وعرق السوس (65±2.40 و65±1.78على التوالي) وغير معنويا مقارنة بمجموعتي الهيبارين والكافئين(68±2.54و68±2.28 علي التوالي), كذلك تفوقت 72± 2.54للحركة الكلية (50± 1.70 وغير معنويا مقارنة بمجموعة الهيبارين والكافئين وعرق السوس 48± 1.78 مقارنة بالسيطرة 55± 2.23) في النسبة المئوية للحركة التقدمية0.05> Pمجموعة البنتوكسي فيلين معنويا (على التوالي) ولم يحصل فرق معنوي في تركيز الحيامن ونسبة التشوهات . 50± 2.40 و 52± 2.30و

لم يلاحظ فرق معنوي في صفات الحيامن لمخففي بنجر السكر والتفاح الاخضر اثناء عملية التنشيط.

4-جمع البويضات من المبايض بطريقتي السحب والتشطيب، جلبت المبايض من سوق الجزارين في البصرة. وكان العدد الكلي للبويضات والبويضات مقبولة النوعية ومعدل البويضات المتحصلة من كل مبيض باستخدام) خلال فترة التجربة مقارنة مع تقنية السحب.0.01> Pتقنية التشطيب أعلى (

) 0.05 <P فرقا معنويا كبيرا (TCM-199) لتحديد تأثير الاوساط الزرعية على معدل نضج بويضات المعز المحلي. أظهر TCM-199 و SOF و 5DMEM-انضاج البويضات في ثلاثة اوساط زرعية مختلفة (مقارنة بالوسطين الاخريين من ناحية توسع الخلايا الركامية عندما يتم انضاج البيوض مختبريا.

. أظهرت النتائج Co_2 في حاضنة TCM-1996-اخصاب بيوض المعز المحلي الناضجة بواسطة الحيامن المجمدة في ثلاث مخففات استعملت في التجربة (مح البيض 10% ,الترس وحليب الماعز) وحضنت في وسط أن الحيامن المخففة بحليب الماعز حققت اكثر نسبة اخصاب مقارنة بمخففي مح البيض 10% والترس (22.4٪ مقابل 13٪ و 10.2٪). اما عدد البويضات المخصبة الكلية هي 40 من مجموع 270 بيضة مستزرعة (14.8٪)

College: Colleg of Veterinary medicine **Name of Student: Khairi Gargan Awaid Alrikabi**

Dep.: veterinary physiology **Name of Supervisor:Abdulrazak naeem khudair Tahir A. Fahad**

Certificatte: master **Specialization: veterinary physiology**

Tital of Thesis

t ***In Vitro* Activation of Thawed Frozen Iraqi Local Buck Spermatozoa and Fertilization of Goat Ova Using Some**

Additives to Certain Media

Abstract of Thesis

Summary Accidental death of valuable and highly genetic characters of male animals might affect its genetic factors distributions unless we create a new strategy to gain their germplasm contents (spermatozoa). The experiment was conducted from February 2016 to February 2017 and included the following:

1 – semen collection from five adult local black bucks (3 - 4 years old) and the average weight of 55 kg by artificial vagina and evaluation of semen (pH , sperm concentration, percentage of massive and individual motility, viability and abnormalities as well as the level of AST and ALT in the seminal plasma).

Semen samples were divided in six aliquots and washed with PBS (1:9) by centrifuging at 1200 × g for 10 min at room temperature and seminal plasma was removed. After that, washing samples were diluted with six different extenders: egg yolk 10% (EY) , tris buffer(TB), camel milk(CM), goat milk(GM), beat pulp juice(BJ) and green apple juice(GJ) extenders. Sperm diluents were divided into 2 parts, one with glycerol and the other without glycerol. The diluent without glycerol was added to spermatozoa before the sperm cells were taken into a refrigerator (5 to 6C°). The sperm-containing tubes were placed in a 250 mL beaker containing 150 mL of 25C° water. After 1.5 h in the refrigerator, when water temperature in the beaker reached 5 to 6C°, the diluent with glycerol was added to the sperm cells in three 10 -min intervals to reach a final concentration of 200×10^6 spermatozoa/mL. Diluted semen was evaluated as for fresh semen and loaded into 1 mL plastic eppendrof and frozen over nitrogen vapors for 10 min, 4 cm above the nitrogen level, plunged and stored in liquid nitrogen. After three months of semen freezing in liquid nitrogen, the samples were thawed at room temperature for 5 min and transferred to a 39 Cº incubator for 20 min and a small aliquot (0.1 mL) was removed from each specimen for the assessment of percent motility, progressive motility, live spermatozoa, normal spermatozoa and the level of AST and ALT .

EY 10% and TB treatments presented higher ($P < 0.05$) percentages of total motility and progressive motility compared with GM, CM, BPJ and GAJ treatments and the result showed that GM and CM treatments presented great similarities in all sperm parameters between them while BPJ and GAJ treatments were lower significantly in all parameters compared to all treatments.

2- Three media (DMEM , SOF and TCM-199) were used to determine the effect of media on an activation of frozen thawed local buck semen, The Specimen of each straw was placed in centrifuge tubes (round bottom) and overlaid carefully with 1,3 ml of culture medium(swim-up method). The tubes must be put in the CO_2 incubator, at an angle around 45° at 39 C° for 60 min, After incubation, the top 1 ml from each tube was removed and pooled in a sterile centrifuge tube and centrifuged (300 g for 10 min). Simple layer technique(swim-up) relies on the ability of spermatozoa to swim out of seminal plasma into culture medium .The supernatant is removed again and the pellet is resuspended in the 1 ml of medium, after processing, sperm parameters were assessed. The result showed great decline in the sperm concentration after and TCM-199 media exhibited higher activation of sperm characteristic regardless of type of extender using in the dilution of specimen.

3- activation of frozen thawed local buck spermatozoa by several chemicals (Heparin, Caffeine, PX and G. glabra), frozen thawed spermatozoa of all experiment extenders incubated in TCM-199 media after treating with above chemicals and using of CO_2 incubator for the separation of spermatozoa by simple layer technique(swim-up). The result of EY10% diluted semen was shown that caffeine exhibited greater ($P<0.05$) sperm conc. and higher percentage of sperm motility(35.6±0.96 ,78±2.54 respectively) than control (33.0±0.70 and 70±2.98 respectively) and G.glabra (33.2±0.65 and 70±2.82 respectively) and non-significant superiority than heparin (34.0±0.79 and 75±1.84 respectively) and PX (34.4±0.76 and 75±3.13 respectively). The treatment with caffeine resulted in a higher ($P<0.05$) percentage of progressive motility(58±2.23) compared to control, PX and G.glabra (46±2.12, 52±1.14 and 50±1.58 respectively) and non-significant difference with heparin (55±1.84), no significant difference among treatments in normal morphology. Nearly similar results obtained from activation of semen prepared from GM and CM extenders, while for TB , PX treatment was presented higher($P<0.05$) total motility compared to control and G.glabra(72±2.54 *vs.* 65±2.40 and 65±1.78 respectively) and non significant difference compared to heparin and caffeine(68±2.54 and 68±2.28 respectively), in addition px treatment exhibited higher ($P<0.05$) progressive motility compared to control(55±2.23 *vs.* 48±1.78) and non significant difference compared to heparin, caffeine and G. glabra(50±1.70, 52±2.30 and 50±2.40 respectively), no significant difference in the sperm concentration and normal morphology. No significant differences were found in sperm parameters after activation of semen diluted with BPJ and GAJ extenders

4- Oocytes were Collected from ovaries by two methods: aspiration and slicing, ovaries were brought from butchers markets in Basra. The overall number of oocytes, acceptable quality oocytes and mean oocytes recovered per ovary using the slicing technique was higher ($P<0.01$) during the period of the experiment, compared to the aspiration technique.

5- Oocyte maturation in three different media (SOF , DMEM and TCM-199) to determine the effect of media on the maturation rate of caprine oocyte .TCM-199 exhibited higher significant ($P<0.05$) difference compared to SOF and DMEM IVM media with regard to cumulus cell expansion when the COCs were matured *in vitro*.

6- in vitro fertilization of mature caprine oocytes with EY10% , TB and GM cryopreserved spermatozoa , TCM-199 medium was used for incubation of samples in Co_2 incubator. The result showed that GM presented greater percentage of fertilized ova than EY10% and TB extenders(22.4% vs. 13% and 10.2%). The total fertilized oocytes are 40 from 270 cultured oocytes (14.8%)