# تقدير تركيز الفركتوز وتركيز بعض العناصر المعدنية في البلازما المنوي للاكباش

**انعام احمد حمزة** قسم علوم الحياة / كلية العلوم جامعة الموصل

**سراب داؤود سليمان** ماجستير في الكيمياء الحياتية

**محمد احمد حمزة**

**الاستلام** ٢٩ / ١١ / ٢٠١١

**القبول** ٠٩ / ٠٤ / ٢٠١٢

## Abstract

The study included determination of ram's semens concentration in 22 samples collected by using artificial vagina with averag of one ejaculate for aweak. The sperm concentration was (2x $10^9$ /ml) and the percentage of life sperms obtained by using the eosin dye (85%) in addition to the use of Trypan blue to show the intact acrosome. The result showed the concentration of fructose in seminal plasma was (21± 6 mmol/ L) The study also included the measurement of the elements concentrations of (zinc, magnesium, calcium, sodium, potassium, and nickel) in ram seminal plasma and the result showed that the order of these concentrations of Na, k, Ca, Zn, Mg, Ni have been decreased respectivly. The presence of these elements in ram semen could have different rols to play in the survival and function of spermatozoa.

## الملخص

تضمنت الدراسة قياس تركيز النطف في٢٢عينة من السائل المنوي للاكباش جمعت العينات باستخدام المهبل الصناعي وبواقع قذفة واحدة اسبوعيا . كان تركيز النطف (X٢ ١٠$^{٩}$/مل) والنسبة المئوية للنطف الحية باستخدام صبغة الايوسين (٨٥%) فضلا عن استخدام صبغة التريبان الزرقاء لبيان سلامة اكروسوم النطف . اظهرت النتائج ان تركيز الفركتوز ف ي البلازما المنوي للا كباش هو (٢١±٦ ملي مول /لتر). تضمنت الدراسة ايضا تقدير تركيز العناصر (الخارصين و المغنيسيوم و الكالسيوم و الصوديوم والبوتاسيوم والنيكل) في البلازما

المنوي للاكباش، أظهرت الدراسة ان ترتيب تراكيز هذه العناصر Ni ،Mg ، Zn، Ca، K،Na تتناقص على التوالي . ان تواجد هذة العناصر في السائل المنوي للاكباش قد يدل على ان لها دورا في الحفاظ على بقاء ووظيفة النطف.

## المقدمة

يمكن تشخيص عدم الخصوبة infertiliy من خلال دراسة حركة واشكال النطف وتقدير تركيزها . وهذه الطرق ليست كافية لتعكس القدرة الاخصابية للعينات . بدلالة ان بعض العينات تمتلك مواصفات جيدة للسائل المنوي ولكنها غير مخصبة لذا فمن المفيد ايجاد مواصفات كيموحيوية تخدم كمؤشرات لعدم الخصوبة مثل هذه المؤشرات انزيم الفوسفاتيز الحامضي، حامض الستريك و مستوى الفركتوز وكذلك تركيز بعض العناصر واهمها Zn. كما يحوي البلازما المنوي مكونا ت عديدة تقوم بتهيئة الظروف الملائمة لحماية وبقاء النطف ، ومن اهم هذه المكونات هو الفركتوز فهو مصدر لطاقة النطف، يفرز من قبل الغدد التناسلية في معظم انواع الحيوانات (2,1).

يشهد السائل المنوي للاكباش تغيرات فصلية من حيث تركيز التستوسيترون وكذلك تركيز الفركتوز في البلازما المنوي اذ وجد ان تركيز الفركتوز في البلازما المنوي للاكباش يزداد في وقت التكاثر (3). ويعد الفركتوز السكر الرئيسئ في البلازما المنوي لمعظم الحيوانات ومن ضمنها الاغنام Sheep و يلعب الفركتوز في البلازما المنوي دورا هاما في العمليات الايضية للنطف. وتستخدمه النطف لإنتاج طاقة على شكل ATP (Adenosine tri phosphate) (4) ويعكس الفركتوز وظيفة الحويصلات المنوية لانه يفرز منها بتأثير هرمون الاندروجين وله تأثير في عمليتي تكوين الخثرة وتميع الدفق المنوي كما ان تحديد مستوى الفركتوز مهم في حالات انسداد القناة المنوية (6,5).

يمتلك البلازما المنوي فعالية لتحليل البروتينات المتواجدة فيه وتحويلها الى احماض امينية حرة. فهناك الانزيمات المحللة للبروتينات فضلا عن وجود عوامل محللة تفرز من الغدة الجنسية لها دور في عمليتي التخثر والتميع للقذفة المنوية (5).

تلعب العناصر المعدنية دورا هاما في عمليات النمو والتكاثر . وعدم موازنتها له تأثير على عملية التكاثر في الحيوانات وبالتالي فان هذا يوثر على الاقتصاد بشكل عام . ان تأثير نقص العناصر الضرورية في الحيوانات له نفس تأثير قلة أعداد الحيوانات الناتجة عن الإصابات والأمراض الطفيلية، فلهذه العناصر أهمية في زيادة مقاومة الكائنات الحية ضد الأمراض (7,5). وكذلك فهي مهمة لوظيفة مختلف الانزيمات والبروتينات ، فايونات الخارصين تساهم في عمليات انقسام الخلايا ونموها وتمايزها وتساهم ايضا في السيطرة على التعبير

الجيني، كما يعمل الخارصين على تنشيط ع مل الخصى فضلا عن مساهمته في عدد من الوظائف الفسلجية للنطف .(8) ان للخارصين أهمية في عمليات النمو وايض الكربوهيدرات والبروتينات والدهون وفي الاستجابة المناعية وله أهمية لسلامة الجلد والشعر والعظام ونمو الغضاريف ونقصانه يؤدي الى ضعف مقاومة الجسم للأمراض عدم السيطرة على حركات الجسم ونقصان في الوزن بسبب نقصان في عمليات الأكسدة والاختزال التي تحدث داخل الجسم . وللخارصين أهمية خاصة في عملية التكاثر ونقصانه يؤثر على عملية نمو وتطور الغدد الجنسية اللاحقة(7).

يعد المغنيسيوم من العناصر الأساسية للانزيمات الخاصة بنقل م جموعة الفوسفات والتفاعلات التي تحتاج إلى ATP. وتشير دراسة الى ان التركيز العالي لل . Mg يثبط حركة النطف (10,9). ويعد الكالسيوم عاملا مساعدا للعديد من الانزيمات وله اهمية كبيرة في السائل المنوي لانه يوثر تأثيراً ايجابيا على ايض النطف وحركتها (7). اما الصوديوم والبوتاسيوم فلهما دور في حفظ التوازن الحامضي القاعدي وفي التقلص العضلي والتحفيز العصبي وتركيزهما في البلازما المنوي مشابه لتركيزهما في بلازما الدم وتكمن اهميتهما في توفير وسط ذو ازموزية مناسبة لبقاء وسلامة النطف. ويشير الباحث Yocol وجماعته (11) بان النيكل يقلل من حركة ومعدل تكوين النطف من قبل البروستات.

**أهداف البحث:**

- تقدير تركيز الفركتوز في السائل المنوي للاكباش لدوره الهام في تزويد النطف بالطاقة اللازمة لحركتها.
- تقدير تركيز بعض العناصر في البلازما المنوي للاكباش لأهميتها في الحفاظ على بقاء وسلامة النطف.

## المواد وطرائق العمل

**تحضير العينات :**

تم جمع ٢٢ عينة من السائل المنوي لثمانية اكباش عواسية بصحة جيدة متواجدة في كلية الطب البيطري بواقع جمعة واحدة أسبوعياً، تم الجمع باستخدام المهبل الصناعي، نقلت العينات الى المختبر مباشرة ووضعت في حمام مائي بدرجة ٣٧ درجة مئوية.

**تحليل السائل المنوي :**

١. **الفحوصات العيانية:** تم تسجيل الفحوصات العيانية للعينات وشملت الحجم، اللون.
٢. **الفحوصات المجهرية:** وشملت:

- **قياس تركيز النطف**

تم حساب اعداد النطف /مل من العينات باستخدام شريحة Haemocytometer من نوع(Improved neuber) الخاصة لعد كريات الدم البيضاء.

- **الحركة الجماعية والحركة الفردية:**

تم تقدير الحركة الجماعية للنطف بوضع قطرة من السائل المنوي للاكباش على شريحة زجاجية ثم تسجيل النسبة المئوية للحركة الجماعية تحت قوة التكبير الصغرى للمجهر الضوئي. اما الحركة الفردية فتم تقديرها بوضع قطرة من السا ئل المنوي للاكباش على شريحة زجاجية ثم اضافة ٥ قطرات من محلول الملح الفسلجي مع وضع غطاء الشريحة، تم تقدير النسبة المئوية للحركة الفردية باستخدام العدسة ذات التكبير العالية .

- **النسب المئوية للنطف الحية :**

تم حساب النسب المئوية للنطف الحية باستخدام مزيج من صبغتي النيكروسين ٥% والتي اضيف اليها ١.٧٦ غرام من صبغة الايوسين الحمراء . وضعت قطرة من المزيج على شريحة زجاجية تحوي على قطرة من السائل المنوي لعمل المسحة ، تركت لتجف ثم تم حساب النطف الحية باستخدام العدسة الزيتية . اذ تتلون النطف الميتة باللون الاحمر بينما تبدو النطف الحية بيضاء اللون.

- **سلامة اكروسوم النطف :**

لبيان سلامة اكروسوم النطف تم استخدام صبغة تريبان الزرقاء وصبغة كمزا، بعد تخفيف العينات بنسبة ١:٢٠ بإضافة ٠.٩% NaCl وضعت قطرة من السائل المنوي المخفف على شريحة زجاجية ثم مزجت مع قطرة من صبغة التريبان الزرقاء ٢% فرشت على الشريحة بعدها جففت بالهواء وأضيف لها المثبت (36مل من 1N HCL إلى 14 مل من 37% من محلول الفورمالديهايد مع اضافة 0.2 غم من Neutral red، تركت لمدة دقيقتين ثم غسلت بالماء المقطر . بعدها صبغت بصبغة كمزا ٧.٥% لمدة ٣ ساعات بدرجة ٣٧ درجة مئوية غسلت بالماء ا لمقطر ووضع غطاء الشريحة بعد تجفيفها . تم فحص المسحات بالمجهر الضوئي باستخدام العدسة الزيتية لحساب مالا يقل عن ٢٠٠ نطفة في كل مسحة صنفت إلى:

خلايا حية مع اكروسوم سليم ، خلايا حية مع اكروسوم سليم وذيل مصبوغ ، خلايا حية مع اكروسوم محطم او مفقود وبنفس الطريقة صنفت الخلايا الميتة (12).

**تقدير تركيز الفركتوز في البلازما المنوي للاكباش**

تم تحضير محلول الفركتوز بتركيز ٢.٧٨ ملي مول/لتر (stock solution) ثم حضر منه المحلول القياسي بتركيز ٠.٢٨ ملي مول/لتر، وتم تحضير كاشف الريسورسينول الذي يعطي لونا احمرا بوجود الفركتوز بدر جات حرارية عالية وبوجود حامض الهيدروكلوريك بتركيز ١٠ مول/لتر (13).

**تحضير راشح البلازما المنوي:** مزج ٠.١ مل من البلازما المنوي مزجت مع ٢.٩ مل من الماء المقطر ثم اضيف لها ٠.٥ مل من محلول هيدروكسيد الباريوم $Ba(OH)_2$ بتركيز ٠.١٥ مول/لتر و ٠.٥ مل من كبريتات الزنك $ZnSO_4$ بتركيز ٠.١٧٨ مول/لتر. تركت لمدة ٥ دقائق لإزالة البروتين بعدها فصلت بجهاز الطرد المركزي 3000 دورة/دقيقة ولمدة ١٥ دقيقة، تم اخذ ١ مل من الراشح لقياس مستوى الفركتوز(13).

| المواد | العينات | محلول الكفء | المحلول القياسي |
|---|---|---|---|
| **راشح (البلازما المنوي)** | ١ مل | | |
| **ماء مقطر** | | ١ مل | |
| **المحلول القياسي للفركتوز** | | | ١ مل |
| **كاشف الريسورسينول** | ١ مل | ١ مل | ١ مل |
| **حامض الهايدروكلوريك** | ٣ مل | ٣ مل | ٣ مل |

تركت المحاليل لمدة ١٠ دقائق بدرجة حرارة 90 درجة مئوية ثم قيست الامتصاصية لجميع المحاليل عند الطول الموجي 490 نانوميتر وتم حساب تركيز الفركتوز حسب المعادلة الآتية (13) :

$$\text{تركيز الفركتوز ملي مول/ لتر} = \frac{\text{امتصاصية العينة}}{\text{امتصاصية المحلول القياسي}} \times ١١.١٢$$

اذ ان الرقم ١١.١٢ يمثل حاصل ضرب تركيز الفركتوز القياسي في عامل التخفيف .

**تقدير مستوى العناصر في البلازما المنوي للاكباش**

تم تقدير مستوى العناصر في البلازما المنوي للاكباش (Ni, K, Na, Ca, Mg, Zn) باستخدام طيف الامتصاص الذري من نوع (England, Philips SP9) في كلية العلوم قسم

علوم الحياة و الذي يعتمد على التغيير في الطاقة عند تبخير العناصر (14). اذ تم تحضير المحلول القياسي لكل عنصر ، ثم حضرت تراكيز مختلفة من المحلول القياسي وقيست امتصاصية النماذج عند الطول الموجي المحدد لكل عنصر (٢١٣Zn نانوميتر ,283Mg نانوميتر ,589 Na نانوميتر و ٧٦٠k نانوميتر و Ni ٢٣٢ نانوميتر). تم تقدير تركيز العناصر في نماذج البلازما استنادا على المنحنى القياسي لكل عنصر .

اما الكالسيوم فتم تقديره باستخدام العدة الجاهزة من شركة BiolaboSA. باستخدم CPC (O-Cresol phtalein complexone) لتحديد التركيزالكلي للكالسيوم . ففي المحلول القاعدي يتفاعل CPC مع الكالسيوم ليعطي مركبا لونيا يقاس امتصاصيته تحت الطول الموجي ٥٧٠ نانوميتر .

**النتائج والمناقشة**

يوضح الجدول رقم ١ مواصفات السائل المنوي للاكباش ، اذ كان متوسط حجم العينات هو 1.2±0.4 مل كانت اعداد النطف 2 ± ٠.٨ x $10^9$ /مل وكانت النسبة المئوية للنطف الحية ٨٥% شكل (١) والنسبة المئوية للحركة الفردية والحركة الجماعية ٨٠%، ٦٥% على التوالي والنسبة المئوية لاشكال النطف الطبيعية ٧٥%. وأظهرت النتائج ان تركيز الفركتوز في السائل المنوي للاكباش ٢١±٦ ملي مول/لتر ويعد هذا التركيز مرتفعا مقارنة بتركيزه في البلازما المنوي للإنسان.

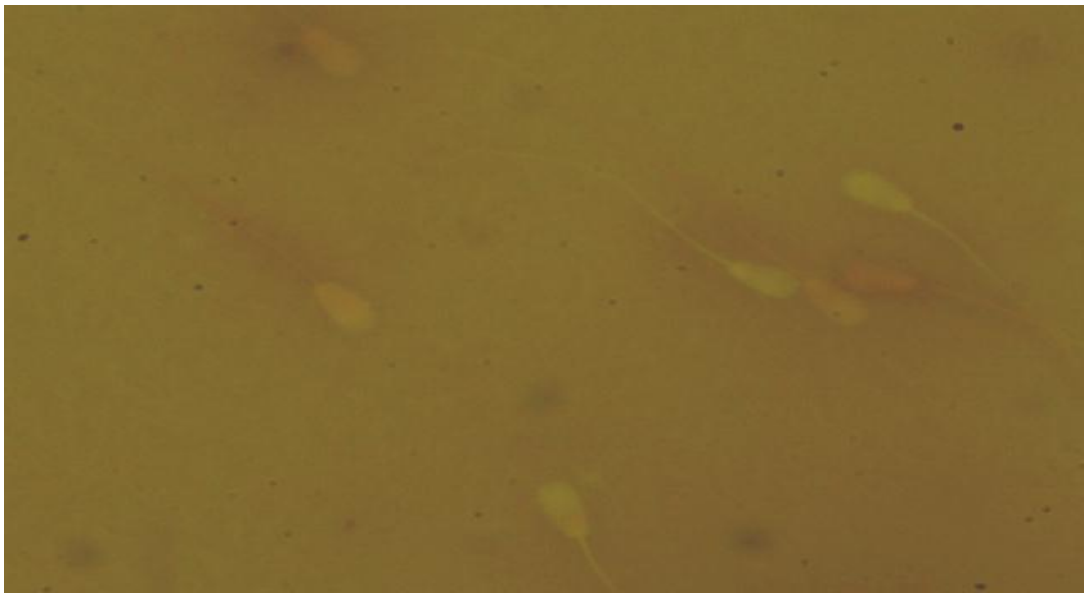
**جدول رقم(1): مواصفات السائل المنوي للاكباش وتركيز الفركتوز**

| العدد | الحجم (مل) المعدل ±الانحراف المعياري | اعداد النطف x ١٠$^9$نطفة/ مل المعدل ±الانحراف المعياري | النسبة المئوية للنطف الطبيعية | النسبة المئوية للحركة الفردية | النسبة المئوية للحركة الجماعية | تركيز الفركتوز ملي مو ل /لتر المعدل ± الانحراف المعياري |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ٢٢ | ١.٢ ± ٠.٤ | ٢ ± ٠.٨ | ٧٥ | ٨٠ | ٦٥ | 21± 6 |

ان تحديد مستوى الفركتوز في البلازما المنوي له أهميته لانه يعكس وظيفة الحويصلات المنوية وخاصة في حالة التهاب الغدد الافرازية الذكرية الذي يؤدي الى ضمور في الحويصلات المنوية وبالتالي يؤثر على كمية الفركتوز المفرزة من قبلها . كما ان انعدام الفركتوز في البلازما المنوي قد يشير الى وجود خلل في الاقنية الوعائية للحويصلات المنوية .(15) كما ان تركيز الفركتوز

في البلازما المنوي للاكباش اظهر تباين بين الاكباش انفسهم بسبب الاختلافات الموجودة بينهم من ناحية عمل الهورمونات (١٦).

**شكل رقم (١): النطف الحية والميتة باستخدام صبغة الايوسين بقوة تكبير x ٢٣٠٤**



**شكل رقم (٢): يوضح سلامة اكروسوم النطف باستخدام صبغة التريبان الزرقاء بقوة تكبير x ٥٧٦٠**

أظهرت نتائج الدراسة ان اعلى تركيز للعناصر في البلازما المنوي للاكباش كان تركيز عنصر الصوديوم بلغ مقداره (٢٨٠ ±١٨ ملي مول/لتر) واقل تركيز كان لعنصر النيكل (٠.٨ ± ٠.٠٩) مايكرو غرام/مل، جدول رقم (2) وكان ترتيب العناصر من الاعلى تركيز الى الادنى تركيز هو :Na، k، Ca، Zn ، Mg، Ni

**جدول رقم (2): تركيز العناصر في البلازما المنوي للاكباش**

| العناصر | تركيز العناصر (المعدل ± الانحراف المعياري) |
|---|---|
| **Zn** مايكرو غرام / مل | ١٨٠ ± ١٣ |
| Mg مايكرو غرام / مل | ١٢٢ ±١٤ |
| **Ca** ملي مول / لتر | ١٧.٩ ± ٣ |
| **Na** ملي مول / لتر | ٢٨٠ ±١٨ |
| **K** ملي مول / لتر | ٦٩ ± ١٤ |
| **Ni** مايكرو غرام / مل | ٠.٨ ± ٠.٠٩ |

أظهرت النتائج وجود اختلاف في تراكيز العناصر في البلازما المنوي للاكباش ويفسر هذا الاختلاف بتباين في وظيفة هـ ذه العناصر ودورها في بقاء النطف وسلامتها . ان العناصر المعدنية ومنها الخارصين والمغنيسيوم والبوتاسيوم والصوديوم تميل الى تكوين معقدات مع مكونات اخرى وتكوين هذه المعقدات يؤدي الى صعوبة قياسها بصورة دقيقة.

أظهرت نتائج الدراسة ان تركيز تركيز عنصر الخارصين في ا لبلازما المنوي للاكباش كان ١٨٠ ± ١٣ مايكروغرام/مل ويعد هذا التركيز مرتفعا مقارنة بعنصر النيكل ويعكس اهمية الخارصين في نمو الغدد الجنسية وفي توالد النطف ، كما ان للخارصين دورا هاما في التقليل من سمية العناصر الاخرى المتواجدة في السائل المنوي . كما ان تواجد الخارصين بكميات اعلى في الجزء الأولي من القذفة المنوية قد يكون السبب في الحركة الجيدة للنطف في هذا الجزء (١٥).

كما أظهرت النتائج ان تركيز المغنيسيوم في البلازما المنوي للاكباش ١٢٢ ±١٤ مايكرو غرام/مل وهذا يعكس اهميته في زيادة ATP المتحرر في خلايا النطف لانه يرتبط مع المغنيسيوم ثم يتحرر منه في المايتوكوندريا وبالتالي فهو يعمل على زيادة الخصوبة . ان انخفاض تركيز المغنيسيوم ينتج عنه حالة القذف السريع وقد يعود سبب هذا النقصان الى عدم كفاءة نظام النقل الفعال الذي يعمل على نقل المغنيسيوم من الدم الى السائل المنوي او قد يعود الى عدم تناول ما يكفي من المغنيسيوم مع وجبات الطعام (٩).

ان وجود الكالسيوم في البلازما المنوي قد يساهم في حركة النطف بتركيزه الامثل لغرض الحصول على إخصاب ناجح(17) اما الصوديوم والبوتاسيوم فعملهما في السائل المنوي مشابه لعملهما في سوائل الجسم الاخرى (11). كما أظهرت النتائج تركيزا منخفضا لعنصر النيكل في

البلازما المنوي للاكباش ٠.٨ ± ٠.٠٩ مايكروغرام / مل لما له من تأثير سلبي على الخصوبة فهو يقلل من حركية ومعدل تكوين النطف من قبل الخصية ويؤثر على انتاج التستوستيرون من خلايا لايدغ(17,15).

## المصادر


**1)** Mandal A, Bhattacharya AK., *Arch Andrologia*, **19**,275-283(1987).

**2)** Heite, H.j., Wetterquer, U.. *Andrologia*, **11**:113-122(1979).

**3)** Barrel, G, K., Lopwood K.R..; *Anim Reprod Sci*, **1**,213-228 (1979).

**4)** Rigau T, Rivera M, Palomo MJ, Fernandez-Novell MJ, Mogas T, Ballester **J,** Pena A, Otaegui PJ, Guinovatr JJ,.*Reproduction*, **123**: 579- 591 (2001).

**5)** Tauber PF, Propping D, Schumacher DFB, Zaneveld LLFD. *J Androl*, **1**:280-288 (1980).

**6)** Szecsi PB, Lilja H. *J. Androl*, **14**,(5),351-358(1993).

**7)** Sahin, T., Investigation of some trace element levels. Ph. D. Thes is. University Yuzuncu Yil, Van-Turkey. (1999).

**8)** Danek, j.. Role of Zinc in stallions. *Med. Wet*. 58: 840-844(2002).

**9)** Kiss A.S; Viski, S; Szollosi, L. etal., **18**:96-9 (1996).

**10)** Huang, y. L; Tseng, W; Lin, T. H.. In vitro effect of metal ions. *J. Toxicol. Environ. Helth*, **62** :259-267(2001).

**11)** Yokol, K; Uthus, E. O; Nielsen, F. H. *Biol. Trace Elem. Rees*, **93**: 141-154 (2003).

**12)** Kovacs, F. G., Foote, R. H. Viability and acrosome staininig of bull. Biotech *Histochem*., 67: 119-124.(1992)

**13)** Huang YF. and Xu, RJ... *J. Androl*, **18**:559-571(1999).

**14)** Tietz N. W. "Text book of clinical chemistry", 3rd ed; W. B. Saundrers Company, U.S.A. Advision of Harcurt Brace and Company, Philadelphi (1999).

**15)** Massnyi, P; Trandzik, J; Nad, P. etal. *Asian J. Androl*, **5**, 101-104 (2003).

**16)** Mastuoka, T; Imai, H; Asakuma, S; Kohno, H; Fukut, Y. Changes offructose. Journal of Reproduction and Development, 52, 805-810 (2006).

**17)** Erman or, M. Kayar, A; Gonul,r. etal. *Jornal of Animal and Veterinary Advances*, **9**, 414-417(2010).