تأثير غرز هرمون الميلاتونين في نوعية السائل المنوي لثيران الهولشتاين:2- العدد الكلي للنطف المتحركة وسلامة الغشاء البلازمي

ساجدة مهدي عيدان*، رائد إبراهيم خليل** وزيد حسن علي[1]**

*قسم الإنتاج الحيواني- كلية الزراعة/ جامعة بغداد

**قسم الإنتاج الحيواني - كلية الزراعة/ جامعة ديالى

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة بهدف بيان تأثير غرز هرمون الميلاتونين في صفات السائل المنوي الطازج والمحفوظ بالتبريد والتجميد لثيران الهولشتاين. نفذت هذه الدراسة في قسم التلقيح الاصطناعي التابع لدائرة الثروة الحيوانية / وزارة الزراعة في منطقة أبو غريب (25 كم غرب بغداد) للمدة من 7/12/2015 ولغاية 1/6/2016 باستعمال 12 ثور هولشتاين تتراوح أعمارها بين 3-5 سنوات وأوزانها بين 500-750 كغم/ ثور وزعت الثيران عشوائيا إلى ثلاثة مجاميع متساوية (4 ثور/ مجموعة)، وقد تركت المجموعة الأولى بدون معاملة وعدت بمثابة مجموعة سيطرة (T1). في الوقت الذي غرزت فيه المجموعتين الثانية (T2) والثالثة (T3) بهرمون الميلاتونين تحت جلد قاعدة الاذن اليسرى بمقدار 54 و72 ملغم على التوالي، وأعيد غرز الهرمون للثيران بعد شهر من الغرزة الأولى. تم جمع السائل المنوي من الثيران بواسطة المهبل الاصطناعي (1قذفة /ثور/ اسبوعياً) لدراسة تأثير غرز هرمون الميلاتونين في صفات السائل المنوي الطازج والمحفوظ بالتبريد وبعد 48 ساعة وأسبوع من الحفظ بالتجميد. أظهرت النتائج وجود تأثيرات معنوية ($P\leq0.05$) للمعاملات في للعدد الكلي للنطف المتحركة، اذ تفوق المعدل العام لكل من المعاملة الثانية والثالثة معنويا ($P\leq0.05$) مقارنة مع المعاملة T1. ارتفع العدد الكلي للنطف السليمة الغشاء البلازمي (10^6) معنويًا ($P\leq0.05$) لدى المعاملتين T2 (بعد 48 ساعة واسبوع من الحفظ بالتجميد وللمعدل العام) و T3 (للسائل المنوي الطازج والتبريد و48 ساعة واسبوع من الحفظ بالتجميد) مقارنة مع المعاملة T1. يمكن الاستنتاج ان غرز الثيران بهرمون الميلاتونين كانت له اثار ايجابية في تحسين نوعية السائل المنوي لدى ثيران الهولشتاين مما ينعكس هذا في تحسين الاداء التناسلي لهذه الثيران وزيادة نسبة خصوبة الابقار مما ينعكس ايجابياً في تطوير انتاجية مراكز التلقيح الاصطناعي وزيادة العائد المادي لمربي الابقار.

الكلمات المفتاحية :هرمون الميلاتونين، نوعية السائل المنوي، ثيران الهولشتاين.

e-mail:dr_staaa@yahoo.com, Dr.Raed@agriculture.uodiyala.edu.iq, Zaidhassan649@yahoo.com

Effect of melatonin implantation on semen quality Holstein bulls:2- Total number of motile sperm and integrity plasma membrane

S. M. Eidan*, R. I. Khalil and Z. H. Ali****

***Dep. Animal Production- College of Agriculture/ University of Baghdad**

****Dep. Animal Production- College of Agriculture/ University of Diyala**

Abstract

This study was conducted to investigate the effect of melatonin implantation on semen quality of Holstein bulls as well as on fresh, cooled and cryopreserved. This study was executed at the department of artificial insemination pertaining to the directorate of animal

[1] البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثالث.

resource ministry of agriculture, Abu-Ghraib (25 km west of Baghdad) during the period from 7th of December, 2015 to 1st of June, 2016 using 12 Holstein bulls of 3-5 years old and 500-750 kg live body weight the bulls were randomly distributed into three equal groups (4 bulls/ group). The first group was left without any treatment, regarding as control group (T1), whereas left, second and third group were subcutaneous-ear implanted with 54 (T2) and 72 (T3) mg of melatonin respectively Re-implantation of hormone was done, one month later. Semen was also collected from each experimental bull via artificial vagina, as once ejaculate per bull weekly to explore the effect of melatonin implantation on fresh, cooled as well as 48hr and 1 week post cryopreservation (PC). The results showed significant effect ($P \leq 0.01$) on the total number of motile sperm (TMS). The overall average of the T2 and T3 treatments was significantly higher ($P \leq 0.01$) compared with the T1. Total plasma membrane integrity of sperm (TPMIS x106) were noticed in T2 (48hr and one week PC as well as for overall mean) and T3 (fresh, cooled, 48hr and one week PC) as compared with the T1 group. The melatonin implantation has a positive role in improving the semen quality of Holstein bulls, which in turn enhancing the reproductive performance and fertility percentage of cows as well as increasing the artificial insemination productivity and owners income.

Keywords: Melatonin hormone, semen quality, Holstein bulls.

المقدمة

تودي عملية حفظ السائل المنوي بالتجميد (Semen cryopreservation) إلى إحداث أضرار في خلايا النطف لدى معظم اللبائن ومنها الثيران(1)، إذ أشارت دراسات عديدة إلى انخفاض معدلات الأخصاب عند استخدام سائل منوي محفوظ بالتجميد مقارنة مع السائل المنوي الطازج (2) كما تؤدي عملية حفظ السائل المنوي بالتجميد إلى تدني نوعية السائل المنوي(3)، من خلال إحداث تدهور في الغشاء البلازمي للنطف وسلامة الاكروسوم وفقدان حركتها وحيويتها وقابليتها الاخصابية، فضلا عن تلف المادة الوراثية (DNA)، (4) ان تعرض النطف لصدمة البرودة تؤدي إلى حدوث تغيرات في الفعالية الأنزيمية الناتجة عن ضرر أغشية النطف وخروج بعض الأنزيمات منها مثل dehydrogenas -Glucose-6-phosphate وبالتالي زيادة نسبة ADP/AMP وانخفاض الطاقة ATP (5). وقد لاحظ (6) ان كل من الاكروسوم والغشاء البلازمي للنطف يعدان من اكثر المواقع المعرضة للضرر أثناء الحفظ بالتبريد، إذ ان التبريد يؤثر على هيكلية الدهون في اغشية النطفة. كما أن عملية تجميد وإسالة السائل المنوي تسبب تراكم أيونات الكالسيوم المرتبطة مع البروتين داخل خلايا النطف وبالتالي تضعف حركتها (7). ان التحرر المستمر لأصناف الاوكسجين التفاعلي (ROS) من قبل النطف غير الناضجة والمشوهة وكريات الدم البيضاء تؤدي الى انخفاض حركتها الفردية وقابليتها الاخصابية (8). تكون نطف اللبائن بصورة عامة ومنها نطف الثيران بشكل خاص عرضة لتأكسد اغشيتها من قبل الجذور الحرة في السائل المنوي بسبب قلة مضادات الأكسدة الطبيعية الموجودة في السائل المنوي مع وجود كميات كبيرة من الاحماض الدهنية غير المشبعة في اغشية النطف (9)، مما يؤدي الى احداث تغيرات في الغشاء البلازمي وفعالية البروتينات الذي له الاثر في تغير نفاذية الماء والمواد المذابة وفقدان حيوية النطف (10). يعد هرمون الميلاتونين (Melatonin) الافراز الرئيسي للغدة الصنوبرية، وتوجد مستقبلاته في العديد من خلايا واعضاء الجسم، مما يشير الى الفعالية الواسعة لهرمون الميلاتونين، أذ يعمل على تنظيم التناغم (Circadian rhythm) اليومي والموسمي للفعاليات الحيوية في الجسم (11)، ومعزز لمناعة الجسم (12)، كما يعمل على ازالة الجذور الحرة بأنواعها المختلفة من خلال تنشيط مضادات الأكسدة الانزيمية (13)، وتثبيط إنزيمات محفزات الأكسدة (14)، وتقليل من

الضغط الجزيئي للأوكسجين (15). وقد وجد ان الميلاتونين يلعب دور في اتزان الكلوكوز(Glucose homeostasis) (16) بالدم والخصية، فضلاً عن تأثيره في نوعية النطف من خلال تنظيم انتاج التستستيرون(17)، وحماية الامشاج والاجنة مختبرياً (18) والمحافظة على سلامة الغشاء البلازمي للنطف وزيادة انتاج الطاقة من قبل المايتوكوندريا(19) وتنظيم ايض خلايا سرتولي وكونه مضاد للموت المبرمج (Anti-apoptosis) بشكل غير مباشر(20). وقد أظهرت دراسات عديدة ان الميلاتونين أكثر كفاءة من مضادات الأكسدة الأخرى كونه محب للدهون والماء والتي يمكن العبور بسهولة عبر الأغشية (21)، مثل حاجز الخصية الدموي (Blood testis barrier) وبالتالي حماية معظم خلايا النطف داخل النبيبات المنوية (22)، من خلال تحفيز نشاط الأنزيمات المضادة للأكسدة (23). ونظرا لأهمية الميلاتونين كمضاد للأكسدة ودوره الفعال في الحفاظ على نوعية النطف من الضرر التأكسدي والذي ينعكس ايجابيا في اطالة مدة حفظ السائل المنوي وتحسين نوعيته وبالتالي زيادة نسب الإخصاب والحمل. ونظرا لعدم وجود دراسات حول تأثير غرز هرمون الميلاتونين في صفات السائل المنوي لثيران الهولشتاين، لذا فقد صممت هذه الدراسة بهدف بيان تأثير غرز هرمون الميلاتونين في بعض صفات السائل المنوي الطازج والمبرد والمحفوظ بالتجميد لمدد مختلفة لدى ثيران الهولشتاين.

المواد وطرائق العمل

أجريت هذه الدراسة في قسم التلقيح الاصطناعي التابع لدائرة الثروة الحيوانية/ وزارة الزراعة في منطقة أبو غريب 25 كم غرب بغداد، للمدة من 7/ 12/ 2015 ولغاية 1/ 6/ 2016 واختير 12 ثور من سلالة الهولشتاين جميعها مدربة على جمع السائل المنوي بطريقة المهبل الاصطناعي (Artificial Vaginal) تتراوح أعمارها بين 3-5 سنوات، وبوزن جسم يتراوح بين 500-750 كغم/ ثور تم إيواء الحيوانات في حظائر مكونة من جزء مضلل بأبعاد (4×4 م) وجزء مكشوف بأبعاد (4×13 م). فحصت جميع الثيران قبل البدء بالدراسة وكانت جميعها بصحة جيدة وخالية من الأمراض وذلك لخضوعها للإشراف البيطري بصورة مستمرة غُذيت جميع الثيران طيلة مدة الدراسة بنظام غذائي موحد، إذ قدم لها العلف المركز يومياً بمعدل 4-6 كغم/ حيوان، وقد كانت العليقة المنتجة في معمل علف المحطة مكونة من 35% شعير و33% نخالة الحنطة و10% ذرة صفراء و20% كسبة فول الصويا و0.5% حجر الكلس و0.5% ملح الطعام و1% فيتامينات وبلغ مستوى البروتين الخام في العليقة 18% وكمية الطاقة 3323 كيلو سعرة لكل كيلو غرام. تألف العلف الخشن (Roughage) من دريس الجت بكمية تتراوح مابين 7-9 كغم/ حيوان/ يومياً والعلف الأخضر بواقع 50-60 كغم/ حيوان/ يومياً. اما قوالب الأملاح والماء الصالح للشرب فكانتا موجودة أمام الحيوانات باستمرار. قسمت الثيران عشوائياً الى ثلاث مجاميع متساوية (4 ثيران/ مجموعة) كالاتي: تركت ثيران المجموعة الأولى بدون أي معاملة وعدت كمجموعة سيطرة (T1). غرزت ثيران المجموعة الثانية (T2) بثلاث غرز من الميلاتونين (54 ملغم) تحت جلد قاعدة الاذن اليسرى. غرزت ثيران مجموعة الثالثة (T3) بأربع غرز من الميلاتونين (72ملغم) تحت جلد قاعدة الاذن اليسرى. أعيد غرز ثيران المجموعة الثانية والثالثة (54 و72ملغم) على التوالي بعد شهر من الغرزة الأولى. وقد احتوت علبة غرز الميلاتونين (®Melovine) (Ceva Sante Animal-France) على 2 شريط، واحتوى كل شريط على 25 غرزة. وكل غرزة تحوي على 18 ملغم من هرمون الميلاتونين، وأيضا تحوي العلبة على أبره Needle تستخدم للغرز تحت جلد الأذن اليسرى.

جمع السائل المنوي بعد اسبوع من المعاملة وذلك باستخدام المهبل الاصطناعي (Artificial Vaginal)، اذ تراوحت درجة الحرارة المهبل الاصطناعي عند الجمع ما بين 41 – 42°م، بدأت عملية الجمع الساعة السابعة صباحاً، بواقع 1 قذفة/ ثور/ اسبوع. ولغرض التهيئة للقذف سمح لكل ثور بقيام بوثبة كاذبة (False mount) وذلك لزيادة الرغبة الجنسية (24)، وتم التأكيد على بقاء مكان وموعد الجمع ثابتين طيلة مدة الدراسة، وقد بلغ عدد القذفات التي جمعت خلال مدة التجربة 120 قذفة، وبمعدل 10 قذفة/ ثور. تم اجراء التخفيف بمخفف Tris المعد مسبقاً بدرجة حرارة 37 مْ واجراء الفحوصات (العدد الكلي للنطف المتحركة والسليمة الغشاء البلازمي)، بعدها وضعت عينات السائل المنوي بعد اجراء الترقيم في بيكر يحتوي على ماء بدرجة حرارة (32 مْ) ونقلت الى الثلاجة وبعد استقرار درجة الحرارة عند درجة (5مْ) تم فحص العدد الكلي للنطف المتحركة والسليمة الغشاء البلازمي. ومن ثم تم تعبئة العينات آليا في قساطر (French straws) بقياس 0.25 مل (IMV, France) ، وإكمال فترة التعادل (Equilibration) والتي أمدها اربع ساعات لتعادل الكليسيرول حسب ما اشار اليه (27)، بعدها نقل الى حوض النتروجين السائل وترك لمدة 10 دقائق في بخار النتروجين (120– مْ)، ثم غمرت في سائل النتروجين (196– مْ) حسب ما اشار اليه (28). قدر العدد الكلي للنطف المتحركة والسليمة الغشاء البلازمي بعد 48 ساعة واسبوع من الحفظ بالتجميد. قدر العدد الكلي للنطف المتحركة طبقا لما جاء به (25)، وقدرت العدد الكلي للنطف السليمة الغشاء البلازمي بحسب طريقة (26). تم إجراء التحليل الإحصائي بتطبيق التجربة العاملية (3×10×4) وفق تصميم القطاعات العشوائية الكاملة بأستخدام مشاهدة واحدة بأعتبار العمر كقطاع لدراسة تأثير المعاملة (T) والاسابيع (W) وفترات الحفظ (P)، باستخدام البرنامج الإحصائي الجاهز SPSS، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باستخدام اختبار (30)عند مستوى معنوية (P<0.05) وبغض النظر عن معنوية اختبار F في جدول تحليل التباين (31)، وباستخدام الأنموذج الرياضي الآتي:

$$Yijkl = \mu+\tau i+Wj+Pk+\tau W(ij)+\tau P(ik) +WP(jk) +\tau WP(ijk) +B +\varepsilon ijkl$$

إذ تمثل:

Yijkl: قيمة المشاهدة للوحدة التجريبية l التي أخذت المستوى k من العامل P والمستوى j من العامل W والمستوى i من العامل T.

μ: المتوسط العام للتجربة.

τi: تأثير المعاملة (i = معاملة السيطرة والميلاتونين1 والميلاتونين2).

Wj: تأثير الأسابيع (j = الاسبوع الاول والثاني والثالث والرابع والخامس والسادس والسابع والثامن والتاسع والعاشر).

Pk: تأثير فترات الحفظ (k = الطازج، بعد التبريد 5°م، بعد 48 ساعة من التجميد، بعد أسبوع من التجميد).

B: تأثير القطاع (l= عمر ثلاث سنوات 2= عمر خمس سنوات).

τW(ij): تأثير التداخل بين المستوى i من العامل T والمستوى j من العامل W.

τP(ik): تأثير التداخل بين المستوى i من العامل T والمستوى P من العامل P.

WP(jk): تأثير التداخل بين المستوى j من العامل W والمستوى k من العامل P.

τWP(ijk): تأثير التداخل بين المستوى i من العامل T والمستوى j من العامل W والمستوى k من العامل P.

εijkl: تأثير الخطأ التجريبي العشوائي للوحدة التجريبية في القطاع l من العامل T والعامل W والعامل P.

النتائج والمناقشة

- **العدد الكلي للنطف المتحركة:** يتضح من جدول (1) وجود تأثيرات معنوي ($P\leq0.05$) للمعاملات في العدد الكلي للنطف المتحركة، إذ تفوق المعدل العام لكل من المعاملة الثانية والثالثة معنويًا ($P\leq0.05$) على المعاملة الأولى، في الوقت الذي لم تختلف المعاملتين الثانية والثالثة معنويًا عن بعضهما في العدد الكلي للنطف المتحركة، وقد بلغ العدد الكلي للنطف المتحركة 8.09±0.08 و8.58± 0.08 و8.48±0.07×10^6 للمعاملة الأولى والثانية والثالثة على التوالي (جدول 2). كما يبين جدول (1) وجود تأثيرات معنوية ($P\leq0.05$) لفترات الحفظ على المعدل العام للعدد الكلي للنطف المتحركة، إذ انخفض العدد الكلي للنطف المتحركة وبشكل معنوي ($P\leq0.05$) بمرور فترات الحفظ بالتبريد وبعد 48 ساعة وأسبوع من الحفظ بالتجميد (جدول1). أشارت قيم التداخل للعدد الكلي للنطف المتحرك وجود فروق معنوية ($P\leq0.05$) بين للمعاملات والسائل المنوي الطازج وفترات الحفظ (تبريد، 48 ساعة وأسبوع من الحفظ بالتجميد) (جدول 2)، إذ بلغ اعلى عدد للنطف المتحركة لدى السائل المنوي الطازج للمعاملة الثالثة (9.39±0.09 ×10^6) واقلها بعد أسبوع من الحفظ بالتجميد لدى المعاملة الأولى (7.33±0.06×10^6). ومن ناحية أخرى لم يكن هنالك أي فرق معنوي لعدد النطف المتحركة بين المعاملات الثلاثة لدى السائل المنوي الطازج وعند التبريد (5م°)، في حين كان هنالك تفوق معنوي لعدد النطف المتحركة لدى المعاملة الثانية (8.32± 0.09×10^6) مقارنة مع المعاملة الأولى (7.73±0.09×10^6) بعد 48 ساعة من الحفظ بالتجميد (جدول 1). تفوقت المعاملتين الثانية والثالثة على المعاملة الأولى في العدد الكلي للنطف المتحركة بعد أسبوع من الحفظ بالتجميد، إذ بلغت 7.33± 0.06 و8.12 ±0.10 و7.88±0.06×10^6 للمعاملات الأولى والثانية والثالثة على التوالي (جدول1). كانت هنالك فروق معنوية ($P\leq0.05$) في المعدل العام للعدد الكلي للنطف المتحركة بين أسابيع التجربة إذ سجل الأسبوع الأول والسابع والتاسع اعلى قيم للمعدل الكلي للنطف المتحركة في حين سجل الأسبوع الخامس اقل قيمة لها (جدول2). إشارة نتائج قيم التداخل للعدد الكلي للنطف المتحركة بين المعاملات وأسابيعها إلى وجود تأثير معنوي ($P\leq0.05$) لدى معظم أسابيع التجربة والمعاملات، إذ تفوقت المعاملة الثانية معنويًا ($P\leq0.05$) عند الأسبوع التاسع (9.20±0.26 ×10^6) مقارنة مع المعاملة الأولى (7.61±0.19 ×10^6) عند الأسبوع الرابع (جدول 3). ومن جانب آخر لم يكن هنالك أي فرق معنوي للعدد الكلي للنطف المتحركة بين المعاملات المختلفة وضمن الأسبوع الواحد على الرغم من التفوق الحسابي الواضح لدى معاملتي هرمون الميلاتونين (T2 و T3) مقارنة مع معاملة السيطرة (T1) ولدى معظم أسابيع التجربة (جدول2). ان التفوق العالي المعنوية للمعدل العام للعدد الكلي للنطف المتحركة لكل من المعاملة الثانية والثالثة على المعاملة الأولى قد يعزى ذلك إلى دور هرمون الميلاتونين في زيادة مستوى ATPase (32)، وبالتالي زيادة الطاقة والتي تعتبر المصدر الأساسي المستخدم من قبل ذيل النطف لبدء وتفعيل الحركة التقدمية الأمامية (33). أو قد يعزى سبب تفوق العدد الكلي للنطف المتحركة لدى المجموعتين T2 و T3 إلى دور هرمون الميلاتونين في تحقيق الحماية والاستقرار للمايتوكوندريا من ضرر الجذور الحرة (34) من خلال تفعيل نشاط أنزيمات المضادة للأكسدة (35). ان تفوق الحركة الفردية لدى المعاملتين الثانية (48 ساعة وأسبوع من الحفظ بالتجميد) والثالثة (أسبوع من الحفظ بالتجميد) على المعاملة الأولى ولدى الأوقات نفسها قد يرجع إلى دور الميلاتونين في تعزيز إنتاج الطاقة (32) وكذلك التحفيز على تكوين إنزيم γ-glutamylcysteine synthase الذي يعمل على زيادة تركيز glutathione (GSH) داخل الخلية (36). أن تحفيز إنتاج الكلوتاثيون داخل الخلايا من خلال الحماية التي يوفرها هرمون الميلاتونين ضد الإجهاد التأكسدي سوف يعمل على تحفيز زيادة عدد الخلايا(36).

جدول (1) تأثير تداخل غرز هرمون الميلاتونين في العدد الكلي للنطف المتحركة (15×10^6 نطفة) للسائل المنوي الطازج والمبرد (5°م) وبعد الحفظ بالتجميد لدى ثيران الهولشتاين (المتوسط ± الخطأ القياسي)

الفترات / المعاملات	الطازج	تبريد عند درجة حرارة 5°م	بعد 48 ساعة من الحفظ بالتجميد	بعد اسبوع من الحفظ بالتجميد	المعدل العام
T1	0.14±8.96 abc	0.12±8.32 de	0.09±7.73 fg	0.06±7.33 g	0.08±8.09 B
T2	0.18±9.19 ab	0.15±8.71 bcd	0.09±8.32 de	0.10±8.12 ef	0.08±8.58 A
T3	0.09±9.39 a	0.09±8.64 cd	0.07±8.01 ef	0.06±7.88 ef	0.07±8.48 A
المعدل العام	0.08±9.19 A	0.07±8.55 B	0.05±8.02 C	0.06±7.78 C	0.04±8.38

*المتوسطات التي تحمل أحرف كبيرة عموديا تشير للمقارنة بين المعاملات، والمتوسطات التي تحمل احرف كبيرة أفقيا تشير للمقارنة بين الفترات المدروسة، والمتوسطات التي تحمل احرف صغيرة أفقيا تشير للمقارنة بين قيم التداخل.

*المتوسطات التي تحمل حروف متشابهة لا تختلف عن بعضها معنويا عند مستوى احتمال ($P \leq 0.05$)وفق اختبار توكي.

T_1 = مجموعة السيطرة ؛ T2 وT3 = غرز الثيران 54 و72 ملغم/ شهر من هرمون الميلاتونين على التوالي واعيدت عملية الغرز للمعاملتين بعد مرور شهر من المعاملة وبالجرعة نفسها.

جدول (2) تأثير تداخل غرز هرمون الميلاتونين والاسابيع على العدد الكلي للنطف المتحركة (15×10^6 نطفة) لدى ثيران الهولشتاين (المتوسط ± الخطأ القياسي)

الأسابيع / المعاملات	الاسبوع الاول	الاسبوع الثاني	الاسبوع الثالث	الاسبوع الرابع	الاسبوع الخامس	الاسبوع السادس	الاسبوع السابع	الاسبوع الثامن	الاسبوع التاسع	الاسبوع العاشر	المعدل العام
T1	0.66±8.01 ab	0.20±8.05 ab	0.40±7.92 ab	0.19±7.61 b	0.29±8.03 ab	0.31±8.20 ab	0.20±7.82 b	0.20±8.40 ab	0.37±8.27 ab	0.30±8.62 ab	0.08±8.09 B
T2	0.18±8.05 ab	0.19±8.64 ab	0.20±8.74 ab	0.33±8.72 ab	0.21±8.14 ab	0.31±8.81 ab	0.16±8.36 ab	0.36±8.74 ab	0.26±9.20 a	0.08±8.44 ab	0.08±8.58 A
T3	0.21±8.35 ab	0.23±8.43 ab	0.24±8.44 ab	0.28±8.44 ab	0.19±8.44 ab	0.24±8.25 ab	0.25±8.25 ab	0.19±8.65 ab	0.30±8.57 ab	0.28±8.98 ab	0.07±8.48 A
المعدل العام	0.14±8.14 A	0.12±8.35 ABC	0.14±8.37 ABC	0.18±8.26 ABC	0.13±8.20 BC	0.17±8.42 ABC	0.12±8.14 A	0.15±8.59 ABC	0.19±8.68 A	0.13±8.68 AB	0.04±8.38

*المتوسطات التي تحمل أحرف كبيرة عموديا تشير للمقارنة بين المعاملات، والمتوسطات التي تحمل احرف كبيرة أفقيا تشير للمقارنة بين الفترات المدروسة، والمتوسطات التي تحمل احرف صغيرة أفقيا تشير للمقارنة بين قيم التداخل.

*المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة تختلف عن بعضها معنويا عند مستوى احتمال ($P \leq 0.05$) وفق اختبار توكي.

T_1 = مجموعة السيطرة؛ T2 وT3= غرز الثيران 54 و72 ملغم/ شهر من هرمون الميلاتونين على التوالي واعيدت عملية الغرز للمعاملتين بعد مرور شهر من المعاملة وبالجرعة نفسها.

- **العدد الكلي للنطف سليمة الغشاء البلازمي:** بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود تأثيرات معنوية ($P\leq0.05$) في المعدل العام للمعاملات في العدد الكلي للنطف السليمة الغشاء البلازمي، إذ ارتفع العدد معنويًا ($P\leq0.05$) لدى المعاملة الثالثة ($11.31\pm0.07\times10^6$) مقارنة مع المعاملتين الثانية ($11.09\pm0.09\times10^6$) والاولى ($10.50\pm0.09\times10^6$) (جدول 3). ومن ناحية اخرى تفوقت المعاملة الثانية في العدد الكلي للنطف السليمة الغشاء البلازمي على المعاملة الأولى. كما يتضح من (جدول3) وجود تأثير معنوي ($P\leq0.05$) في المعدل العام لفترات الحفظ على العدد الكلي للنطف سليمة الغشاء البلازمي خلال مدة التجربة، إذ انخفضت هذه الصفة ($P\leq0.05$) وبشكل تدريجي بمرور فترات الحفظ بالتبريد والتجميد لمدة 48 ساعة وأسبوع. وقد سجل اعلى عدد للنطف السليمة الغشاء البلازمي لدى السائل المنوي الطازج ($11.71\pm0.05\times10^6$) ثم تلته فترات الحفظ بالتبريد ($11.26\pm0.07\times10^6$) و48 ساعة ($10.63\pm0.08\times10^6$) وأسبوع ($10.26\pm0.09\times10^6$) من الحفظ بالتجميد (جدول 3). كما أشارت نتائج التحليل الإحصائي لقيم التداخل في العدد الكلي للنطف السليمة الغشاء البلازمي بوجود فروقات معنوية ($P\leq0.05$) ما بين المعاملات، إذ تفوقت المعاملة الثالثة في العدد الكلي للنطف سليمة الغشاء البلازمي ($11.97\pm0.11\times10^6$) معنويا ($P\leq0.05$) على المعاملة الأولى ($11.41\pm0.12\times10^6$) لدى السائل المنوي الطازج (جدول3). في حين لم يكن هنالك اي اختلاف معنوي بين المعاملة الثانية والمعاملتين الاولى والثالثة وعند نفس الفترة. لكن ارتفع العدد الكلي للنطف السليمة الغشاء البلازمي لدى المعاملة الثالثة معنويا ($P\leq0.05$) مقارنة مع المعاملة الاولى عند التبريد و48 ساعة واسبوع من الحفظ بالتجميد (جدول3). ومن جهة أخرى لم يكن هنالك أي فرق معنوي بين المعاملة الثانية والمعاملتين الأولى والثالثة عند التبريد، وأظهرت المعاملة الثانية ارتفاعا معنويًا ($P\leq0.05$) للعدد الكلي للنطف السليمة الغشاء البلازمي بعد 48 ساعة وأسبوع من الحفظ بالتجميد مقارنة مع المعاملة الأولى (جدول 3). كانت هنالك فروق معنوية للمعدل العام للنطف سليمة الغشاء البلازمي بين أسابيع التجربة المختلفة، وقد تراوح المعدل العام له بين 10.58 ± 0.15 – $11.37\pm0.17\times10^6$. يتضح من نتائج قيم التداخل للعدد الكلي للنطف السليمة الغشاء البلازمي بين المعاملات والأسابيع إلى وجود تأثير معنوية ($P\leq0.05$)، إذ تفوقت المعاملة الثالثة ضمن الأسبوع الرابع ($11.92\pm0.12\times10^6$) على المعاملة الأولى ضمن الأسبوع السابع ($9.97\pm0.35\times10^6$) (جدول4). ومن جانب آخر لم يكن هنالك أي فرق معنوي للعدد الكلي للنطف السليمة الغشاء البلازمي بين المعاملات المختلفة وضمن الأسبوع الواحد على الرغم من التفوق الحسابي الواضح لدى معاملتي هرمون الميلاتونين (T2 و T3) مقارنة مع معاملة السيطرة (T1) ولدى معظم أسابيع التجربة. ان التفوق المعنوي للمعدل العام للعدد الكلي للنطف السليمة الغشاء البلازمي لكل من المعاملة الثانية والثالثة على المعاملة الأولى يعود إلى زيادة النسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي (جدول3) أولا. وهذه الزيادة قد يعزى إلى دور هرمون الميلاتونين في زيادة نشاط أنزيمات مضادات الأكسدة (37) مثل السوبر أوكسيد دسميوتيز (SOD) (38) وخفض أعلى مستوى من الجذور الحرة (39) وبالتالي الحفاظ على سلامة الغشاء البلازمي للنطف. ان تفوق المعاملة الثالثة خلال فترة (الطازج والحفظ بالتبريد والتجميد لمدة 48 ساعة وأسبوع) والثانية (48 ساعة وأسبوع من الحفظ بالتجميد) على المعاملة الأولى ولدى الأوقات نفسها قد يرجع ذلك إلى دور هرمون الميلاتونين في حماية النطف من ضرر الجذور الحرة الناتجة عن عملية الأيض (40)، وذلك عن طريق خفض مستوى الأوكسجين التفاعلي (ROS) وأوكسيد النتريك ($NO^{\cdot}$)(41).

جدول (3) تأثير تداخل غرز هرمون الميلاتونين في العدد الكلي للنطف السليمة الغشاء البلازمي (15×10^6) نطفة لدى السائل المنوي الطازج وبعد الحفظ بالتبريد والتجميد لثيران الهولشتاين (المتوسط ± الخطأ القياسي)

الفترات / المعاملات	الطازج	تبريد عند درجة حرارة 5°م	بعد 48 ساعة من الحفظ بالتجميد	بعد اسبوع من الحفظ بالتجميد	المعدل العام
T_1	0.12±11.41 bc	0.12±10.88 cde	0.13±10.06 fg	0.12±9.64 g	0.09±10.50 C
T_2	0.17±1.17 ab	0.13±11.32 bcd	0.14±10.84 de	0.13±10.49 ef	0.09±11.09 B
T_3	0.11±11.97 a	0.11±11.60 ab	0.01±11 cde	0.10±10.67 e	0.07±11.31 A
المعدل العام	0.05±11.71 A	0.07±11.26 B	0.08±10.63 C	0.09±10.26 D	0.05±10.97

*المتوسطات التي تحمل أحرف كبيرة عموديا تشير للمقارنة بين المعاملات، والمتوسطات التي تحمل احرف كبيرة أفقيا تشير للمقارنة بين الفترات المدروسة، والمتوسطات التي تحمل احرف صغيرة أفقيا تشير للمقارنة بين قيم التداخل.

*المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة تختلف عن بعضها معنويا عند مستوى احتمال ($P\leq0.05$) وفق اختبار توكي.

T_1 = مجموعة السيطرة ؛ T2 و T3 = غرز الثيران 54 و72 ملغم/ شهر من هرمون الميلاتونين على التوالي واعيدت عملية الغرز للمعاملتين بعد مرور شهر من المعاملة وبالجرعة نفسها.

جدول (4) تأثير تداخل غرز هرمون الميلاتونين والأسابيع في العدد الكلي للنطف السليمة الغشاء البلازمي (15× 10^6 نطفة) لدى ثيران الهولشتاين (المتوسط± الخطأ القياسي)

الأسابيع / المعاملات	الأسبوع الأول	الأسبوع الثاني	الأسبوع الثالث	الأسبوع الرابع	الأسبوع الخامس	الأسبوع السادس	الأسبوع السابع	الأسبوع الثامن	الأسبوع التاسع	الأسبوع العاشر	المعدل العام
T_1	0.36±11.03 abcd	0.27±10.76 abcd	0.37±10.39 bcd	0.29±10.65 abcd	0.32±10.57 abcd	0.13±10.55 bcd	0.35±9.97 d	0.35±10.57 abcd	0.31±10.36 bcd	0.29±10.13 cd	0.09±10.50 C
T_2	0.40±11.37 abc	0.24±11.03 abcd	0.27±11.24 abcd	0.25±11.53 ab	0.25±10.42 bcd	0.25±11.34 abc	0.15±11.14 abcd	0.25±10.64 abcd	0.30±10.76 abcd	0.24±11.47 abc	0.09±11.09 B
T_3	0.25±11.28 abcd	0.17±11.29 abcd	0.28±11.46 abc	0.12±11.92 a	0.25±11.53 ab	0.20±11.48 abc	0.19±10.90 abcd	0.23±10.53 bcd	0.19±11.30 abcd	0.17±11.41 abc	0.07±11.31 A
المعدل العام	0.19±11.23 AB	0.14±11.03 ABC	0.19±11.03 ABC	0.17±11.37 A	0.18±10.84 BCD	0.14±11.12 AB	0.17±10.67 CD	0.15±10.58 D	0.17±10.81 BCD	0.18±11 ABC	0.05±10.97

*المتوسطات التي تحمل أحرف كبيرة عموديا تشير للمقارنة بين المعاملات، والمتوسطات التي تحمل احرف كبيرة أفقيا تشير للمقارنة بين الفترات المدروسة، والمتوسطات التي تحمل احرف صغيرة أفقيا تشير للمقارنة بين قيم التداخل.

*المتوسطات التي تحمل حروف متشابهة لا تختلف عن بعضها معنويا عند مستوى احتمال ($P\leq0.05$) وفق اختبار توكي.

T_1 = مجموعة السيطرة؛ T2 و T3 = غرز الثيران 54 و72 ملغم/ شهر من هرمون الميلاتونين على التوالي واعيدت عملية الغرز للمعاملتين بعد مرور شهر من المعاملة وبالجرعة نفسها.

المصادر

1. Amirat-Briand, L.; Bencharif, D.; Vera-Munoz, O.; Bel Hadj Ali, H.; Destrumelle, S.; Desherces, S.; Schmidt, E.; Anton, M. & Tainturier, D. (2009). Effect of glutamine on post-thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low density lipoproteins) extender: Preliminary results. Theriogenology. 71: 1209-1214.
2. Bailey, J. L.; Bilodeau, J. F. & Cormier, N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. J. Androl., 21: 1-8.
3. Mahfouz, R.; Sharma, R.; Thiyagarajan, A.; Kale, V; Gupta, S.; Sabanegh, E. & Agarwal, A. (2010). Semen characteristics and sperm DNA fragmentation in infertile men with low and high levels of seminal reactive oxygen species. Fertil. Steril., 94 (6): 2141- 2146.
4. Medeiros, C. M.; Forell, F.; Oliveira, A. T. & Rodrigues, J. L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better. Theriogenology, 57: 327-344.
5. Manafi, M. (2011). Artificial Insemination in Farm Animals. Published by In Tech Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka. Croatia.
6. Kumaresan, A.; Ansari, M. R. & Garg, A. (2006). Modulation of post thaw sperm functions with oviductal proteins in buffaloes. Anim. Reprod. Sci., 90: 73-84.
7. Schuh, K.; Cartwright, E. J.; Jankevics, E.; Bundschu, K.; Liebermann, J.; Williams, J. C.; Armesilla, A. L.; Emerson, M.; Oceandy, D.; Knobeloch, K. P. & Neyses, L. (2004). Plasma membrane Ca+2 ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. J. Biol. Chem. 279: 28220-28226.
8. Fraczek, M.; Szumala-Kakol, A.; Jedrzejczak, P.; Kamieniczna, M. & Kurpisz, M. (2007). Bacteria trigger oxygen radical release and sperm lipid peroxidation in in vitro model of semen inflammation. Fertil. Steril., 88: 1076-1085.
9. Taşdemir, U.; Büyükleblebici, S.; Tuncer, P. B.; Coşkun, E.; Ozgürtaş, T.; Aydın, F. N.; Büyükleblebici, O. & Gürcan, I. S. (2013). Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. Cryobiology, 66:38-42.
10. Purdy, P. H.; Mocé, E.; Stobart, R.; Murdoch, W. J.; Moss, G. E.; Larson, B.; Ramsey, S.; Graham, J. K. & Blackburn, H. D. (2010). The fertility of ram sperm held for 24h at 5 degrees C prior to cryopreservation. Anim. Reprod. Sci., 118(2-4): 231-235.
11. Amin, M. A. (2006). Influence of circadian rhythm on the physical and mental performance. MSc. Thesis. Louisiana state University.
12. Haldar, K. C. (2012). Correlation between peripheral melatonin and general immune status of domestic goat, Capra hircus: A seasonal and sex dependent variation. Small Rumin Res., 107: 147-156.
13. Pablos, M. I.; Reiter, R. J.; Ortiz, G. G.; Guerrero, J. M.; Agapito, M. T.; Chuang, J. I. & Sewerynek, E. (1998). Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. Neurochem. Int., 32: 69-75.
14. Rodriguez, C.; Mayo, J. C.; Sainz, R. M.; Antolín, I.; Herrera, F.; Martín, V. & Reiter, R. J. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. J. Pineal Res., 36(1):1-9.

15. Reiter, R. J.; Tan, D. X.; Manchester, L. C. & Qi, W. (2001). Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. Cell. Biochem. Biophys., 34(2):237-256.
16. Cipolla-Neto, J.; Amaral, F. G.; Afeche, S. C.; Tan, D. X. & Reiter, R. J. (2014). Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. J. Pineal Res., 56:371-381.
17. Ortiz, A.; Espino, J.; Bejarano, I.; Lozano, G. M.; Monllor, F.; García, J. F.; Pariente, J. A. & Rodríguez, A. B. (2011). High endogenous melatonin concentrations enhance sperm quality and short-term in vitro exposure to melatonin improves aspects of sperm motility. J. Pineal. Res., 50:132-139.
18. Cruz, M. H.; Leal, C. L.; da Cruz, J. F.; Tan, D. X. & Reiter, R. J. (2014). Role of melatonin on production and preservation of gametes and embryos. a brief review. Anim. Reprod. Sci., 145:150-160.
19. Martin, M.; Macías, M.; León, J.; Escames, G.; Khaldy, H. & Acuña-Castroviejo, D. (2002). Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. Int. J. Biochem. Cell. Biol., 34: 348-357.
20. Rocha, C. S.; Martins, A. D.; Rato, L.; Silva, B. M.; Oliveira, P. F. & Alves, M. G. (2014). Melatonin alters the glycolytic profile of Sertoli cells: implications for male fertility. Mol. Hum. Reprod., 20 (11):1067-1076.
21. Reiter, R. J.; Tan, D. X.; Gitto, E.; Sainz, R. M.; Mayo, J. C.; Leon, J.; Manchester, L. C.; Vijayalaxmi, Kilic, E. & Kilic, U. (2004). Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage. Pol. J. Pharmacol., 56: 159-170.
22. Lena, P. J. & Subramanian, P. (2003). Evaluation of the antiperoxidative effects of melatonin in ammonium acetate-treated Wistar rats. Pol. J. Pharmacol., 55:1031-1036.
23. El-Sokkary, G. H.; Kamel, E. S. & Reiter, R. J. (2003). Prophylactic effect of melatonin in reducing lead-induced neurotoxicity in the rat. Cell. Mol. Biol. Lett., 8:461-470.
24. Badawy, A. M.; Yaseen, A. M.; El-Bashary, A. S. & Ibrahim, M. A. (1973). Effect of sexual preparation on some characteristics of the semen of buffaloes and cattle bulls. Alex. J. Agric. Res., 21: 185-191.
25. Walton, A. (1933). Technique of artificial insemination. Mp. Bur. Anim. Genet. 56. Iiius-Edinburgh.
26. Jeyendran, R. S. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to the other sperm characteristics. J. Reprod. Fertil., 70:219-228.
27. Salhab, S. A. & Merilan, C. P. (1991). Some effects of collection equipment, glycerolation and post-thaw re-equilibration times on the motility and survival of bovine spermatozoa. Anim. Reprod. Sci., 24:53-61.
28. Mitchell, J. R. & Doak, G. A. (2004). The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle (including information pertaining to goat, sheep, horses, swine and other animals): a handbook and laboratory manual, Ninth edition. Upper Saddle River, NJ. Peason Education. Inc., PP.57-135.
29. Salamon, S. & Visser, D. (1972). Effect of composition of tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. Aust. J. Biol. Sci., 25: 605-618.
30. Tukey, J. W. (1953). Some selected quick and easy methods of statistical analysis.transactions of the New York Acad-emy of sciences, Series. 16:88-97.

31. الراوي، خاشع محمود وعبد العزيز محمد حلف الله. (1980). تصميم وتحليل التجارب الزراعية. دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل. العراق.

32. Chen, L. D.; Kumar, P.; Reiter, R. J.; Tan, D. X.; Manchester, L. C.; Chambers J. P.; Poeggeler, B. & Saarela, S. (1994). Melatonin prevents the suppression of cardiac Ca^{+2} stimulated ATPase activity induced by Alloxan. Am. J. Physiol., 267: 57-62.

33. Burger, B.; Vander Horst, G. & Menkveld, R. (1991). Relationship between biochemical markers and fertilization in vitro. Presented at the Annual Reproductive Biology Work Seminar, Pretoria, South Africa.

34. Lopez, A.; García, J. A.; Escames, G.; Venegas, C.; Ortiz, F.; López, L. C. & Acuña-Castroviejo, D. (2009). Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. J. Pineal. Res., 46(2): 188-198.

35. Reiter, R. J.; Tan, D. X.; Osuna, C. & Gitto, E. (2000). Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress-a review. J. Biomed. Sci., 7: 444-458.

36. Urata, Y.; Honma, S.; Goto, S.; Todoroki, S.; Iida, T.; Cho, S.; Honma, K. & Kondo, T. (1999). Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. Free Radic. Biol. Med., 27:838-847.

37. Gitto, E.; Tan, D. X.; Reiter, R. J.; Karbownik, M.; Manchester, L. C.; Cuzzocrea, S.; Fulia, F. & Barberi, I. (2001). Individual and synergistic antioxidative actions of melatonin: Studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferrrioxamine (desferoxamine) in rat liver homogenates. J. Pharm. Pharmacol., 53: 1393-1401.

38. Reiter, R. J.; Guerrero, J. M.; Garcia, J. J. & Acuña-Castroviejo, D. (1998). Reactive oxygen intermediates, molecular damage and Aging: Relation to melatonin. Ann. N.Y. Acad. Sci., 854: 410-424.

39. Bize, I. B.; Oberley, L. W. & Morris, H. P. (1980). Superoxide dismutase and superoxide radical in Morris hepatomas. Cancer Res., 40: 3686-3693.

40. Ahn, H. J. & Bae, I. H. (2004). Effects of Melatonin on the Meiotic Maturation of Mouse Oocytes in vitro. Korean J. Fertil. Steril., 31: 155-168.

41.du Plessis, S. S.; Hagenaar, K. & Lampiao, F. (2010). The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. Andrologia., 42: 112-116.