Journal homepage
www.ajas.uoanbar.edu.iq
Anbar Journal of Agricultural Sciences
(University of Anbar – Agriculture College)

تأثير استبدال سائل البلازما بالمخفف الصناعي وهرمون الميلاتونين في صفات السائل المنوي المبرد للديكة المحلية العراقية

مؤمن حمدي عطاالله* محمد علاء البيار

كلية الزراعة – جامعة الانبار

***المراسلة الى:** مؤمن حمدي عطاالله، قسم الانتاج الحيواني، كلية الزراعة، جامعة الانبار، الرمادي، العراق.

البريد الالكتروني: moiman385@gmail.com

Article info

Received: 2022-09-05
Accepted: 2022-10-02
Published: 2023-12-31

DOI-Crossref:
10.32649/ajas.2023.179771

Cite as:
Attallah, M. H., and M. A. Al-Bayar. (2023). Effect of centrifugation and melatonin hormone on cooled semen characteristics of Iraqi local roosters. Anbar Journal of Agricultural Sciences, 21(2): 643-655.

©Authors, 2023, College of Agriculture, University of Anbar. This is an open-access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

الخلاصة

اجريت هذه التجربة في حقول الدواجن التابعة لقسم الانتاج الحيواني / كلية الزراعة جامعة الانبار. خلال المدة من 1/ كانون الاول /2021 ولغاية 2/ نيسان/ 2022 وذلك باستخدام 40 ديك بعمر 33 اسبوع من ذكور الدجاج المحلي العراقي بهدف دراسة تأثير عملية خزن السائل المنوي بعد اجراء عملية طرد مركزي واستبدال البلازما المنوية بمخفف Lake 1960 مع إضافة هرمون الميلاتونين كمضاد أكسدة في صفات السائل المنوي. بعد اجراء عملية جمع السائل المنوي لخمسة مرات قسمت العينة الى خمسة معاملات وبواقع ثلاث مكررات لكل معاملة في كل عملية جمع وكالاتي: T1: معاملة السيطرة، T2: اضافة المخفف بنسبة 1:2 فقط، T3: إضافة مخفف حاوي على هرمون الميلاتونين بتركيز ($1\ mMol.\ L^{-1}$) بنسبة 1:2، T4: استخدام الطرد المركزي مع اضافة المخفف بنسبة 1:2 فقط، T5: استخدام الطرد المركزي مع اضافة مخفف حاوي على هرمون الميلاتونين بتركيز ($1\ mMol.\ L^{-1}$) بنسبة 1:2 وخزنت جميع العينات تحت درجة تبريد 5 م° ولمدة 72 ساعة. اظهرت النتائج تفوق معنوي ($P<0.01$) للمعاملة T3 لمؤشرات جودة السائل المنوي (النسبة المئوية للحركة الفردية للحيامن) والحيامن الميتة والتشوهات الكلية عند فترة خزن 36 ساعة بالمقارنة بمعاملة السيطرة وباقي المعاملات وخلال فترات الخزن المختلفة بينما لم تسجل باقي المعاملات اية فروق معنوية. نستنتج من هذه الدراسة الى امكانية اضافة هرمون الميلاتونين بتركيز ($1\ mMol.\ L^{-1}$) الى مخففات حفظ السائل المنوي وذلك لتحسين صفات السائل المنوي من خلال دور

الهرمون كمضاد اكسدة الذي يعمل على خفض الاجهاد التأكسدي على الحيامن.

كلمات مفتاحية: السائل المنوي، طرد مركزي، هرمون الميلاتونين، حفظ بالتبريد، الدجاج المحلي العراقي.

EFFECT OF CENTRIFUGATION AND MELATONIN HORMONE ON COOLED SEMEN CHARACTERISTICS OF IRAQI LOCAL ROOSTERS

M. H. Attallah* **M. A. Al-Bayar**
College of Agriculture - University of Anbar

***Correspondence to:** Moamin Hamdi Attallah, Department of Animal Production, College of Agriculture, University of Anbar, Ramadi, Iraq.
Email: moiman385@gmail.com

Abstract

This experiment was conducted in the poultry fields of the Department of Animal Production / College of Agriculture, University of Anbar. During the period from From 1 December 2021 to 1 April 2022, by using 40 Iraqi native roosters at age 33 week. In order to study the effect of semen storage process after semen centrifugation and replacement of seminal plasma with Lake diluent 1960 intended for semen preservation with the addition of the hormone melatonin as an antioxidant on semen quality characteristics. This study was carried out by 200 birds (40 roosters and 160 chickens) raised in a hall divided into cages. It was divided into five treatments for each treatment three replicates according to the following division: T1: control treatment T2: add dilution in a ratio of 1:2 only T3: add diluent containing the hormone melatonin at a concentration (1 mMol. L^{-1}) T4: use centrifugation with Adding the diluent in a ratio of 1:2 only T5: using centrifugation with the addition of a diluent containing the hormone melatonin at a concentration of (1 mMol. L^{-1}), and for a period of 72 hours, the results showed a significant superiority ($P<0.01$) of the T3 treatment for the indicators of semen quality (Sperm motility, percentage of dead sperm, total abnormalities, acrosome, head, midsection and tail) at a 36-hour storage period compared to the control treatment and the rest of the treatments and during the different storage periods, while the rest of the treatment did not record any significant differences. We conclude from this study that it is possible to add the hormone melatonin at a concentration of (1 mMol. L^{-1}) to semen preservation diluents in order to improve the characteristics of semen through the role of the hormone as an antioxidant, which reduces oxidative stress on sperms.

Keywords: Semen, Centrifugation, Melatonin hormone, Cryopreservation, Iraqi native roosters.

المقدمة

يتكون السائل المنوي بشكل عام من الحيامن التي تسبح بسائل يدعى بالبلازما المنوية، وتعرف البلازما المنوية على انها مركب بيولوجي معقد يرافق الحيامن اثناء عملية القذف ejaculation ويؤثر بشكل فعال في حياة الحيامن للأنواع المختلفة من الحيوانات (37). وتشتق هذه السوائل من القناة الصادرة القريبة proximal efferent ducts والبربخ بالنسبة للحيوانات الحاوية عليه (22). وتبين وجود تأثيرات ضارة للبلازما ا لمنوية في حيامن الدجاج والرومي اثناء عملية الخزن خارج الجسم (10). اذ وجد ان البلازما المنوية في حيامن الطيور تؤثر بشكل كبير على طرق حفظ وخزن السائل المنوي وعلى الحفاظ على فعالية وحيوية الحيامن، من خلال تأثيراتها الضارة في تخزين الحيامن على المدى القريب والبعيد (5). كما ان التفاعل ما بين البلازما المنوية والحيامن يحفز من التغيرات الايضية مما قد يؤدي الى ارتباط البروتينات الموجودة في البلازما المنوية على سطوح اغشية الحيامن مما قد يؤثر سلبا في عملية تخزين النطف في الجهاز التناسلي الانثوي وبالتالي حدوث انخفاض معنوي في نسبة الاخصاب (11 و20).

ونتيجة لكل هذه الأسباب أصبح الغشاء الخلوي لحيامن الطيور بشكل عام والدجاج بشكل خاص حساس جدا للعوامل المؤكسدة الموجودة في مكونات البلازما المنوية خاصة انها لا تملك الانزيمات الكافية لمقاومة عمليات الاكسدة، مما يجعلها عرضة لمهاجمة الجذور الحرة ROS وبالتالي التلف السريع لمكونات الحيامن (18). ونتيجة لعدم وجود طريقة كفؤة لخزن السائل المنوي لفترات طويلة بالتبريد دون حدوث تدهور في صفات الحيامن ونسب الاخصاب، توجهت انظارنا الى محاولة إيجاد طريقة جديدة لخزن السائل المنوي مع الحفاظ على الفعالية الحيوية للحيامن وبنسبة اخصاب عالية من خلال دراسة تأثير عملية الطرد المركزي للسائل المنوي (غسل الحيامن) واستبدال البلازما المنوية بمخفف Lake (21) وتأثيرها في خزن السائل المنوي مع إضافة الميلاتونين كمضاد للأكسدة كطريقة للتقليل من الاضرار التي تصيب الحيامن اثناء عملية الخزن بالتبريد عند درجة 5م°.

المواد وطرائق العمل

اجريت هذه التجربة في حقول الدواجن التابعة لقسم الانتاج الحيواني / كلية الزراعة جامعة الانبار خلال المدة من 1/ كانون الاول /2021 ولغاية 2/ نيسان/ 2022 وذلك باستخدام 40 ديك وبعمر 33 اسبوع من الدجاج المحلي العراقي. ربيت في قاعة مقسمة الى اقفاص (مساحة كل قفص 3 * 1.5 م) بطريقة التربية الأرضية وبواقع 8 طير لكل قفص. غذيت جميع الطيور بعليقة متوازنة من جميع احتياجات الطيور من المواد الغذائية والعناصر المعدنية والفيتامينات وطبقا لما ورد في تقارير مجلس البحث الوطني الامريكي (33) (الجدول 1) اذا قدم 90 g لكل طير يوميا وعلى وجبتين، وكان البرنامج الضوئي هو 15 ساعة اضاءة و9 ساعات ظلام. دربت الذكور على عملية جمع السائل المنوي لمدة 3 اسابيع عن طريق استخدام طريقة المساج الظهري البطني Massage Abdominal وحسب طريقة (8) بواقع مرة واحدة لكل 3 ايام ولمدة 3 اسابيع لتعويد الطيور على اعطاء سائل منوي نظيف وبكمية مناسبة، وتمت عملية الجمع في الساعة التاسعة صباحاً وقد مزجت العينات وذلك للتخلص

من الفروقات الفردية بين الديكة واجريت الفحوصات اللازمة لتقيم السائل المنوي الخام ومن ثم تقسيمه بالتساوي على المعاملات المختلفة باستخدام مخفف lake (21) (جدول 2).

وكما يلي– المعاملة الاولى (T1): بدون طرد مركزي وبدون اضافة اي مخفف اي السائل منوي طازج بدون اضافة او معاملة (مجموعة السيطرة). المعاملة الثانية (T2): اضافة المخفف فقط بنسبة 1:2 الى السائل المنوي. المعاملة الثالثة (T3): اضافة المخفف الحاوي على هرمون الميلاتونين ($1\ mMol.\ L^{-1}$) بنسبة 1:2 الى السائل المنوي. المعاملة الرابعة (T4) في هذه المعاملة تم فصل البلازما المنوية عن الحيامن بواسطة عملية الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق وتم التعويض عن البلازما المنوي التي تم عزلها بنسبة مساوي من المخفف فقط وبعدها تم اضافة المخفف فقط كذلك بنسبة 1:2 الى السائل المنوي. المعاملة الخامسة (T5) في هذه المعاملة تم اجراء عملية الطرد المركزي للسائل المنوي وتم التعويض عن البلازما المنوية التي تم عزلها بنسبة مساوية من المخفف المضاف له الميلاتونين بنسبة ($1\ mMol.\ L^{-1}$) ومن ثم تم اضافة المخفف مع الميلاتونين بنسبة 1:2 الى السائل المنوي. وتم دراسة كل من الصفات التالية:

الحركة الفردية للحيامن Individual motility: تم حساب الحركة الفردية للحيامن حسب الطريقة التي اشارة اليها (4).

جدول 1 نسب مكونات المواد العلفية الداخلة في تكوين عليقة التجربة.

المواد العلفية	النسبة المئوية %
ذرة صفراء	50.7
حنطة	18.34
كسبة فول الصويا (48% بروتين)	17.3
مركز بروتين حيواني*	5
ثنائي كالسيوم فوسفات	1.75
مسحوق حجر الكلس	6.82
NaCl	0.09
المجموع الكلي	100%
التحليل الكيميائي المحسوب**	
البروتين الخام	16.72
طاقة (كيلوسعرة طاقة ممثلة/لكل كغم علف)	2799.028
ميثايونين (%)	0.379
ميثايونين + السستين (%)	0.671
لايسين (%)	0.85
لينولينك (%)	1.5
أرجنين (%)	0.85
الكالسيوم (%)	3.453
الفسفور متيسر(%)	0.53
الصوديوم (%)	0.17
الكلور (%)	0.17

** حسبت قيم العلائق على وفق ما أوردته تقارير مجلس البحوث الأمريكي National Research Council (33). وتم استخدام برمكس الوافي كمصدر بروتيني مركز.

Table 1 Levels of components of feed materials included in the composition of the experimental diet. The dietary composition includes corn, wheat, soybean meal (with a protein content of 48%), animal protein concentrate, dicalcium phosphate, limestone powder, and sodium chloride.

جدول 2 التركيب الكيميائي لمخفف السائل المنوي (Lake) المستخدم في التجربة.

Components	Gm^{-1}.100ml water
Sodium glutamate	1.92
Potassium citrate	0.128
Sodium Acetate	0.5132
Magnesium chloride,6H2O	0.0676
Fructose	1.000
PH	7.0

Table 2 Chemical composition of semen diluent (Lake) used in the experiment.

نسبة الحيامن الميتة Dead sperm ratio: تم حساب نسبة الحيامن الميتة حسب الطريقة التي اشارة اليها (4). وكما في المعادلة التالية:

$$\text{نسبة الحيامن الميتة} = \frac{\text{عدد الحيامن الميتة}}{\text{عدد الحيامن الكلية}} \times 100$$

نسبة الحيامن المشوهة Deformation spermatozoa ratio: تم تصبيغ الحيامن المشوهة حسب الطريقة التي اشار اليها (3) وحسب المعادلة التالية:

$$\text{نسبة الحيامن المشوهة} = \frac{\text{عدد الحيامن المشوهة}}{\text{عدد الحيامن الكلية}} \times 100$$

التحليل الإحصائي: استعمل البرنامج الإحصائي SAS– Statistical Analysis System (38) في تحليل البيانات لدراسة تأثير المعاملات المختلفة في الصفات المدروسة وفق تصميم عشوائي كامل (CRD)، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار Duncan (12) متعدد الحدود.

النتائج والمناقشة

يلاحظ من الجدول 3 عدم وجود فروقات معنوي بين معاملات التجربة خلال الفترة الاولى من الحفظ 0 ساعة، اما بالفترة الثانية فيلاحظ وجود ارتفاع معنوي ($P<0.01$) للمعاملة T3 عند فترة خزن لمدة 24 ساعة وارتفاع معنوي ($P<0.05$) للمعاملة T2 عند فترة خزن 48 ساعة بالمقارنة بمجموعة السيطرة في الحركة الفردية للحيامن، بينما لم تسجل باقي المعاملات أي فروق معنوية للحركة الفردية للحيامن بالمقارنة بمجموعة السيطرة اثناء فترات الخزن المختلفة. اما عند المقارنة بين فترات الحفظ المختلفة ضمن المعاملة الواحدة فقد لوحظ علاقة العكسية ما بين النسبة المئوية للحركة الفردية للحيامن مع زيادة فترة الحفظ اذ انخفضت النسبة المئوية للحركة الفردية للحيامن مع زيادة فترة الحفظ، بينما حافظت كل من المعاملة T2 وT3 على صفات جيدة من الحركة الفردية للحيامن الى حد مدة حفظ 36 ساعة حيث بلغت قيمتها 78.75 و79.25% للمعاملتين وتبدأ بعد هذه الفترة تدهور الحركة بشكل معنويا ($P<0.01$) بعد 48 ساعة من الحفظ بالتبريد.

ان الزيادة معنوية في الحركة الفردية للحيامن ضمن المعاملة T3 مقارنة مع معاملة السيطرة وعند فترة الخزن 36 ساعة قد يعزى الى دور هرمون الميلاتونين المضاد للأكسدة في كبح الجذور الحرة والمحافظة على حيوية السائل

المنوي وابقاء حيوية النطف اطول فترة ممكنة، اذ يلعب هرمون الميلاتونين دورًا مهمًا في وظائف الحيامن اذ يحافظ على حركة الحيامن ويقلل من نسبة الحيامن الميتة والحيامن المشوهة (19 و34). وان قدرته المضادة للأكسدة في السائل المنوي للأنواع المختلفة من الجذور الحرة خلال دوره في الحفاظ على تركيز الحيامن اذ ويقلل من نسبة الحيامن الميتة والحيامن المشوهة ومنع الموت المبرمج للخلايا والتقليل من أثر الاجهاد التأكسدي (31)، اذ ان قدرة الميلاتونين في كبح الجذور الحرة مرتبطة بصلته الوثيقة على قابليته على عبور كل الحواجز الشكلية والفسيولوجية للخلايا المختلفة والمكونات الخلوية من خلال ما يمتلكه من صفات فيزيائية وكيميائية (36). كما ان التأثير الوقائي لهرمون الميلاتونين يعود إلى طبيعة خصائصه المضادة للأكسدة المباشرة وغير المباشرة، اذ يعمل كمضاد اكسدة مباشر في ازالة جذور الأوكسجين والنيتروجين الحرة (ROS، RNS) واما الغير مباشرة اذ يعمل من خلال تنشيط انتاج مضادات الاكسدة الانزيمية وتثبيط الإنزيمات المحفزة للأكسدة (41). كما يرجع هذا التحسن إلى قدرة الميلاتونين في كبح الجذور الحرة (27 و35). ثم تقليل بيروكسيد الدهون أثناء التخزين عن طريق تقليل Polyunsaturated fatty acids(PUFAs) في غشاء الحيامن (29).

واتفقت هذه النتائج مع ما توصل اليه (31) الذين أفادوا بأن اضافة الميلاتونين للحيامن البشرية الى المخففات التي تستخدم في عمليات التجميد تعزز من التأثير الوقائيً من إنتاج ROS وتلف الغشاء. واتفقت هذه النتيجة مع ما توصل اليه (2) اذ تبين بان اضافة الميلاتونين الى مخفف Lake (21) اعطى اثرا ايجابيا على الحركة الفردية للحيامن في السائل المنوي المحفوظ بالتبريد 5Cº.

جدول 3 تأثير استخدام الطرد المركزي وهرمون الميلاتونين على النسبة المئوية للحركة الفردية للحيامن في سائل المنوي للدجاج المحلي العراقي.

المعاملات	مدة الحفظ / ساعة					مستوى المعنوية
	0	24	36	48	72	
T1	96.0±0.912(1) A a	78.50±7.02 B a	56.25±11.43A b	31.25±10.68AB c	4.75±0.25 A d	**
T2	96.75±0.750A a	91.00±1.35 AB a	78.75±1.25 A ab	53.75±14.34 A b	20.0±15.13 A b	**
T3	96.00±1.22 A a	93.00±0.91 A a	79.25±4.04 A a	36.25±18.30 AB b	21.25±16.63 A b	**
T4	96.75±0.629 A a	88.00±3.13 AB a	60.00±9.128 A b	5.50±0.50 B c	0.00±0.00 A c	**
T5	95.00±0.408 A a	90.50±1.65 AB a	56.00±17.10 A b	6.50±1.55 B c	1.25±1.25 A c	**
مستوى المعنوية	N.S	**	**	*	**	

T1: معاملة السيطرة، T2: اضافة المخفف، T3: إضافة مخفف حاوي على هرمون الميلاتونين، T4: استخدام الطرد المركزي مع اضافة المخفف فقط، T5: استخدام الطرد المركزي مع اضافة مخفف حاوي على هرمون الميلاتونين. (1) المتوسط± الخطأ القياسي. الفروق المعنوية تشير الى وجود فروق معنوية بين المعاملات الخمسة بشكل عمودي (الاحرف الكبيرة) وبين الفترات الخمسة بشكل افقي (الاحرف الصغيرة).

*و** تمثل الفروق المعنوية (P<0.05) و(P<0.01) على التوالي وN.S تشير الى عدم وجود فروق معنوية.

Table 3 Effect of using centrifugation and the hormone melatonin on the percentage of individual sperm motility in the semen of local Iraqi chickens. In the first 0-hour storage period, Table 3 shows no significant differences between experimental treatments. In the second period, T3 treatment saw a

significant increase (P<0.01) and T2 treatment saw a significant increase (P<0.05) at a 24-hour storage period. Unlike the control group, stored for 48 hours in individual sperm movement.

يلاحظ من الجدول 4 وجود ارتفاع معنوية (P<0.01) لنسبة الحيامن الميتة بين المعاملات التجربة خلال الفترة الاولى من الحفظ 0 ساعة إذ وجدة ارتفاع معنوي (P<0.01) للمعاملة T5 لفترة الحفظ 0 ساعة بالمقارنة مع معاملة السيطرة ,اما بالنسبة لبقية الفترات 24 و36 و48 و72 لا يوجد فرق معنوي بين المعاملات والسيطرة .اما عند المقارنة بين فترات الحفظ المختلفة ضمن المعاملة الواحدة وجد ان العلاقة طردية ما بين النسبة المئوية للحيامن الميتة مع زيادة مدة الحفظ اذ زادة النسبة المئوية للحيامن الميتة بزيادة مدة الحفظ اذ لوحظ ان المعاملة T2 وT3 اعطت اقل نسبة مئوية للحيامن الميتة ضمن الفترة 36 ساعة حيث بلغت قيمتها 17.50، 13.00% للمعاملتين مقارنة بمعاملة السيطرة وتبدأ بعد هذه الفترة ارتفاع النسبة المئوية للحيامن المية بشكل معنويا (P<0.01) بعد 48 ساعة من الحفظ بالتبريد.

جدول 4 تأثير استخدام الطرد المركزي وهرمون الميلاتونين على نسبة الحيامن الميتة في سائل المنوي للدجاج المحلي العراقي.

المعاملات	مدة الحفظ / ساعة					مستوى المعنوية
	0	24	36	48	72	
T1	2.50±0.95[(1)] AB b	8.50±4.94 A b	27.50±3.79 A a	35.00±8.53 A a	40.00±5.43 A a	**
T2	4.25±1.97 AB b	9.00±3.02 A b	17.50±3.30 A ab	29.25±11.50 A ab	36.75±12.43 A a	*
T3	1.75±0.478 B c	5.00±1.35 A c	13.00±3.36 A bc	24.50±7.57 A b	39.00±5.65 A a	**
T4	6.50±2.10 AB b	9.75±1.43 A b	22.50±8.43 A ab	44.25±11.28 A a	40.00±6.41 A a	**
T5	7.25±1.70 A b	9.00±1.65 A b	19.00±2.08 A b	41.00±10.87 A a	48.50±7.30 A a	**
مستوى المعنوية	**	N.S	N.S	N.S	N.S	

T1: معاملة السيطرة، T2: اضافة المخفف، T3: إضافة مخفف حاوي على هرمون الميلاتونين، T4: استخدام الطرد المركزي مع اضافة المخفف فقط، T5: استخدام الطرد المركزي مع اضافة مخفف حاوي على هرمون الميلاتونين. [(1)] المتوسط± الخطأ القياسي. الفروق المعنوية تشير الى وجود فروق معنوية بين المعاملات الخمسة بشكل عمودي (الاحرف الكبيرة) وبين الفترات الخمسة بشكل افقي (الاحرف الصغيرة).

*و** تمثل الفروق المعنوية (P<0.05) و(P<0.01) على التوالي وN.S تشير الى عدم وجود فروق معنوية.

Table 4 The effect of using centrifugation and the hormone melatonin on the percentage of dead sperm in the semen of local Iraqi chickens. Table 4 shows a significant increase (P<0.01) in dead sperm between experimental treatments during the first 0 hour preservation period, with treatment T5 showing a higher percentage (P<0.01) than the control treatment.

ان الانخفاض المعنوي في نسبة الحيامن الميتة ضمن المعاملة T3 في الفترة 36 ساعة مقارنة مع معاملة السيطرة قد يعود الى الدور الفعال الذي يلعبه الميلاتونين في الحفاظ على جودة الحيامن من خلال عمله كمضاد اكسدة، اذ يعمل على ازالة الجذور الحرة والمحافظة على سلامة الغشاء البلازمي للحيامن اثناء الحفظ بالتبريد (2). يرجع ذلك أساسًا إلى حقيقة طبيعة هرمون الميلاتونين الذي يسمح له بالمرور عبر جميع الحواجز الفيزيولوجية للخلية وإنه أحد أكثر مضادات الأكسدة فعالية في حماية الخلايا من الإجهاد التأكسدي الناجم عن الجذور الحرة (17).

بالإضافة إلى ذلك فإن طبيعة هرمون الميلاتونين المحبة للدهون تسمح له بسهولة بعبور أغشية الخلايا والعمل مباشرة في أعضاء مختلفة بما في ذلك العضيات الداخلية للحيامن (24 و36). ونتيجة لدور هرمون الميلاتونين كمضاد اكسدة فقد عملت إضافة هذا الهرمون الى المخفف عند المعاملة T3 على التقليل من النسب المئوية للحيامن الميتة والمشوهة في فترة الخزن 36 ساعة بسبب قدرة الميلاتونين العالية على التخلص من الجذور الحرة (6). وبالتالي التقليل من الاجهاد التأكسدي (15 و28). ونتيجة لهذه الأسباب مجتمعة فان التحسن المعنوي لصفات الحيامن قد يكون كنتيجة للانخفاض في تلف عضيات خلايا الحيامن الذي يؤدي الى التقليل من نشاط الميتوكوندريا (40). كما سبب في منع الإجهاد التأكسدي والتشوهات التي تسببها الـ ROS وبالتالي خفض الخلل الذي يحدث في الميتوكوندريا.

يبين الجدول 5 وجود ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في نسبة الحيامن المشوهة بين معاملات التجربة خلال فترة الحفظ 0 ساعة مقارنة اذ كان اعلى ارتفاع معنوي لـ T5، اما الفترة 24 ساعة فقد كان هنالك تفوق معنوي ($P<0.01$) ضمن المعاملات التجربة اذ اعطت معاملة السيطرة اعلى نسبة حيامن مشوهة ومن ثم يأتي بعدها المعاملة الخامسة والرابعة والثالثة على التوالي، وبالنسبة لبقية الفترات لم تكن هنالك اي فروق معنوية ضمن المعاملات الخمسة.

اما عند المقارنة بين فترات الحفظ فنلاحظ من النتائج ان العلاقة طردية ما بين الزيادة معنوية في نسبة الحيامن المشوهة مع زيادة فترة الحفظ وقد اعطت المعاملة الثانية والثالثة عند فترة الحفظ 36 ساعة أفضل النتائج اذ بلغت أدنى قيم لهما 35.75 و32.50 للمعاملتين ضمن هذه الفترة مقارنة مع معاملة السيطرة، ومن بعدها حدث ارتفاع معنوي ($P<0.01$) في نسبة الحيامن المشوهة بعدة 48 ساعة من الحفظ بالتبريد.

جدول 5 تأثير استخدام الطرد المركزي وهرمون الميلاتونين على نسبة التشوهات الكلية للحيامن في سائل المنوي للدجاج المحلي العراقي.

المعاملات	مدة الحفظ / ساعة					مستوى المعنوية
	0	24	36	48	72	
T1	12.25±2.09(1) B d	29.95±4.85 A c	44.75±5.66 A b	75.00±5.98 A a	77.25±5.21 A a	**
T2	12.50±2.87 B c	13.00±3.82 B c	35.75±7.86 A b	54.00±9.83 A ab	69.75±9.43 A a	**
T3	12.50±2.72 B c	15.75±2.13 AB c	32.50±8.27 A bc	51.25±11.70 A ab	94.25±15.42 A a	**
T4	13.75±1.70 B d	21.25±7.02 AB cd	38.50±8.04 A bc	57.50±6.98 A ab	66.00±6.04 A a	**
T5	21.50±0.80 A b	21.00±2.97 AB b	40.50±9.24 A b	64.00±7.44 A a	76.25±8.86 A a	**
مستوى المعنوية	*	**	N.S	N.S	N.S	

T1: معاملة السيطرة، T2: اضافة المخفف، T3: إضافة مخفف حاوي على هرمون الميلاتونين، T4: استخدام الطرد المركزي مع اضافة المخفف فقط، T5: استخدام الطرد المركزي مع اضافة مخفف حاوي على هرمون الميلاتونين. (1) المتوسط± الخطأ القياسي. الفروق المعنوية تشير الى وجود فروق معنوية بين المعاملات الخمسة بشكل عمودي (الاحرف الكبيرة) وبين الفترات الخمسة بشكل افقي (الاحرف الصغيرة).

*و** تمثل الفروق المعنوية ($P<0.05$) و($P<0.01$) على التوالي وN.S تشير الى عدم وجود فروق معنوية.

Table 5 Effect of using centrifugation and the hormone melatonin on the percentage of total semen abnormalities in the semen of local Iraqi chickens. Table 5 indicates a significant increase (P<0.05) in deformed sperm percentage during the 0-hour preservation period, higher for T5. The control treatment had the highest percentage of deformed sperm over a 24-hour period (P<0.01), followed by the fifth, fourth, and third treatments. The five treatments were similar for the remaining periods.

ان الانخفاض في النسبة الكلية للحيامن المشوهة مقارنة مع معاملة السيطرة قد يعزى هذا الى فعل هرمون الملاتونين في حماية الحيامن من التشوهات من خلال فعله كمضاد للأكسدة وتقليله من الاجهاد التأكسدي من خلال تقليل الجذور الحرة وحماية الغشاء البلازمي من التلف. اذ يشير (23) الى ان الميلاتونين يمكن أن تثبت وتحمي الميتوكوندريا وأغشية البلازما من الإجهاد التأكسدي عند إضافتها إلى مخففات السائل المنوي للديك أثناء عملية الحفظ بالتبريد، تسهل خاصية الميلاتونين المحبة للدهون الانتقال عبر الأغشية الخلوية وتراكم الميلاتونين داخل الميتوكوندريا.

للميلاتونين تأثير ايجابي على بنية خلايا الحيامن المحفوظة بالتبريد كتأثيرها على سلامة اغشية البلازما ونشاط الميتوكوندريا اذ تنعكس هذه الآثار للميلاتونين على غشاء الحيمن بشكل إيجابي في وظائف الحيامن وحركتها (36). ويمكن أن يكون التأثير الإيجابي للميلاتونين على نشاط الميتوكوندريا هو الحفاظ على طاقة في هذه العضية المطلوبة لحركة خلايا الحيامن بعد الحفظ بالتبريد (30). ويعزى ايضا الى ان هرمون الميلاتونين قلل من نسبة الأحماض الدهنية غير المشبعة في فوسفوليبيدات اغشية الحيامن ولكنه لم يؤثر في حركة الحيامن وخصوبتها (29). نظرًا لأن النسبة العالية من الأحماض الدهنية غير المشبعة تؤدي إلى زيادة قابلية التعرض لأكسدة الدهون في اغشية الحيامن (42). اذ يمكن أيضًا تحفيز التأثيرات الوقائية لمضادات الأكسدة ضد الأكسدة عن طريق إعادة ترتيب تكوين الأحماض الدهنية في فوسفوليبيدات اغشية الحيامن (25).

اما بالنسبة لمعاملات الطرد المركزي فتشير نتائج التجربة الى انخفاض معنوي في حركة الحيامن وارتفاع معنوي في نسبة الحيامن المية وتشوهات الحيامن الكلية وقد يعزى هذا الى الدور الرئيسي للمعادن الضرورية لحركة الحيامن وسلامتها ومن هذه المعادن هو الصوديوم Na^+ والبوتاسيوم K^+ والكلور Cl^+ اذ تحتوي البلازما المنوية على العديد من الايونات التي تكون مهمة في حركة حيامن ومعادلة حموضة البلازما المنوية التي تسبح فيها الحيامن وهذه الايونات تؤثر على حركة الحيامن وسلامة اغشيتها وقدرتها على الاخصاب (1، 7 و13). اذ ينظم كل من Na وK في البلازما المنوية التوازن التناضحي لدعم خلايا الحيامن ويدخل في تركيب وتنشيط العديد من الإنزيمات المهمة (9). اذ تحافظ هذه العناصر على التوازن التناضحي للسائل المنوي وهي ضرورية ايضا لعمليات التمثيل الغذائي للحيامن، وكذلك قدرة الحيامن على الاخصاب وحركتها (16 و26). تبين أن حركة حيامن الديكة وحيويتها كانت مرتبطة بمحتوى البلازما المنوية من الكالسيوم والمغنيسيوم والحديد والنحاس (14). ان المعادن هي مكونات مهمة لمخففات السائل المنوي لأنها تساهم في الحفاظ على التوازن التناضحي وتركيب بعض الإنزيمات الأولية المتعلقة بعملية التمثيل الغذائي ووظيفة الحيامن وبقائها على قيد الحياة والتي ترتبط بقدرة التخزين والتخصيب في المختبر ونجاح الإخصاب بعد التلقيح الاصطناعي (39).

الاستنتاجات: ان الطرد المركزي واستبدال البلازما المنوية قد إثر سلبا على صفات الحيامن عند اليوم 0 بينما كان له تأثير ايجابي إذا ما قورن ببقية المعاملات عند استمرار الخزن.

ان معاملة السائل المنوي بإضافة هرمون الملاتونين الى مخفف الحفظ ادى الى تحسين صفات السائل المنوي عند مدة الحفظ 36 ساعة اذ قلل من نسبة الحيامن الميتة وتشوهات الكلية.

المصادر

1. Alavi, S. M. H., and Cosson, J. (2006). Sperm motility in fishes: Effects of ions and osmotic pressure. Cell Biology International, Campinas, 30(1): 1-14.
2. Al-Bayar, M. A., ALjugaifi, W. I., Mansoor, A. R., Nassif, O. M., and Atallah, M. H. (2019). Effect of supplementing extender with melatonin on iraqi native semen quality during cooling storage. Biochemical and Cellular Archives, 19(2): 2971-2975.
3. Al-Daraji, H. J., B. T. O. Al-Tikriti, Kh. H. Hassan, and A. A. Al-Rawi. (2002). Using new techniques to estimate abnormalities in the semen of birds. Journal of Life Technology Research. 4(1): 47-64.
4. Al-Daraji, H. J. (2007). Artificial Insemination in Poultry Birds - Ministry of Higher Education and Scientific Research - College of Agriculture - University of Baghdad.
5. Atessahin, A., Bucak, M. N., Tuncer, P. B., and Kızıl, M. (2008). Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze–thawing process. Small Ruminant Research, 77(1): 38-44.
6. Bejarano, I., Monllor, F., Marchena, A. M., Ortiz, A., Lozano, G., Jiménez, M. I., ... and Espino, J. (2014). Exogenous melatonin supplementation prevents oxidative stress-evoked DNA damage in human spermatozoa. Journal of pineal research, 57(3): 333-339.
7. Browne, R. K., Kaurova, S. A., Uteshev, V. K., Shishova, N. V., McGinnity, D., Figiel, C. R., ... and Cosson, J. (2015). Sperm motility of externally fertilizing fish and amphibians. Theriogenology, 83(1): 1-13.
8. Burrows, W. H., and Quinn, J. P. (1937). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. Poultry Science, 16(1): 19-24.
9. Cevik, M., Tuncer, P. B., Taşdemir, U., and Özgürtaş, T. (2007). Comparison of spermatological characteristics and biochemical seminal plasma parameters of normozoospermic and oligoasthenozoospermic bulls of two breeds. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 31(6): 381-387.
10. Douard, V., Hermier, D., Labbe, C., Magistrini, M., and Blesbois, E. (2005). Role of seminal plasma in damage to turkey spermatozoa during in vitro storage. Theriogenology, 63(1): 126-137.
11. Druart, X., and de Graaf, S. (2018). Seminal plasma proteomes and sperm fertility. Animal reproduction science, 194: 33-40.
12. Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F tests. biometrics, 11(1): 1-42.

13. Dzyuba, V., and Cosson, J. (2014). Motility of fish spermatozoa: from external signaling to flagella response. Reproductive Biology, 14(3): 165-175.
14. Gałęska, E., Wrzecińska, M., Kowalczyk, A., and Araujo, J. P. (2022). Reproductive Consequences of Electrolyte Disturbances in Domestic Animals. Biology, 11(7): 1006.
15. García, J. J., López-Pingarrón, L., Almeida-Souza, P., Tres, A., Escudero, P., García-Gil, F. A., ... and Bernal-Pérez, M. (2014). Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review. Journal of pineal research, 56(3): 225-237.
16. Harchegani, A. B., Irandoost, A., Mirnamniha, M., Rahmani, H., Tahmasbpour, E., and Shahriary, A. (2019). Possible mechanisms for the effects of calcium deficiency on male infertility. International journal of fertility and sterility, 12(4): 267.
17. Hardeland, R., Cardinali, D. P., Srinivasan, V., Spence, D. W., Brown, G. M., and Pandi-Perumal, S. R. (2011). Melatonin—A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. Progress in neurobiology, 93(3): 350-384.
18. Henkel, R., Kierspel, E., Stalf, T., Mehnert, C., Menkveld, R., Tinneberg, H. R., ... and Kruger, T. F. (2005). Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. Fertility and Sterility, 83(3): 635-642.
19. Jang, H. Y., Kim, Y. H., Kim, B. W., Park, I. C., Cheong, H. T., Kim, J. T., ... and Yang, B. K. (2010). Ameliorative effects of melatonin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. Reproduction in domestic animals, 45(6): 943-950.
20. Kumar, A., Sridharn, T. B., and Rao, K. A. (2019). Role of seminal plasma proteins in effective zygote formation-A success road to pregnancy. Protein and Peptide Letters, 26(4): 238-250.
21. Lake, P. E. (1960). Studies on the dilution and storage of fowl semen. Reproduction, 1(1): 30-35.
22. Long, J. A. (2014). Applied andrology in chickens and turkeys. Animal Andrology. Theories and Applications. Chenoweth PJ and Lorton SP, editors. CABI, Boston MA, USA, 197-225.
23. López, A., García, J. A., Escames, G., Venegas, C., Ortiz, F., López, L. C., and Acuña-Castroviejo, D. (2009). Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. Journal of pineal research, 46(2): 188-198.
24. Maitra, S. K., and Hasan, K. N. (2016). The role of melatonin as a hormone and an antioxidant in the control of fish reproduction. Frontiers in endocrinology, 7: 38.
25. Maldjian, A., Cerolini, S., Surai, P., and Speake, B. K. (1998). The effect of vitamin E, green tea extracts and catechin on the in vitro storage of turkey spermatozoa at room temperature. Poultry and Avian Biology Reviews, 9(4): 143-151.

26. Malik, M. I., Jamil, H., Qureshi, Z. I., Mehfooz, A., Rizvi, S. N. B., Ullah, S., ... and Khan, M. S. (2018). 32. Investigation on relationship of hormonal profile and biochemical constituents of seminal plasma with physical characteristics of Damani buck semen. Pure and Applied Biology (PAB), 7(2): 684-691.
27. Malm, G., Haugen, T. B., Rylander, L., and Giwercman, A. (2017). Seasonal fluctuation in the secretion of the antioxidant melatonin is not associated with alterations in sperm DNA damage. Asian Journal of Andrology, 19(1): 52.
28. Manchester, L. C., Coto-Montes, A., Boga, J. A., Andersen, L. P. H., Zhou, Z., Galano, A., ... and Reiter, R. J. (2015). Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. Journal of pineal research, 59(4): 403-419.
29. Meamar, M., Shahneh, A. Z., Zamiri, M. J., Zeinoaldini, S., Kohram, H., Hashemi, M. R., and Asghari, S. (2016). Preservation effects of melatonin on the quality and fertility of native Fars rooster semen during liquid storage. Czech Journal of Animal Science, 61(1): 42-48.
30. Medeiros, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D., and Rodrigues, J. L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. Theriogenology, 57(1): 327-344.
31. Miguel-Jiménez, S., Pina-Beltrán, B., Gimeno-Martos, S., Carvajal-Serna, M., Casao, A., and Pérez-Pe, R. (2021). NADPH Oxidase 5 and melatonin: Involvement in ram sperm capacitation. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 9: 655794.
32. Najafi, A., Adutwum, E., Yari, A., Salehi, E., Mikaeili, S., Dashtestani, F., ... and Asadi, E. (2018). Melatonin affects membrane integrity, intracellular reactive oxygen species, caspase3 activity and AKT phosphorylation in frozen thawed human sperm. Cell and tissue research, 372: 149-159.
33. Nrc. (1994). Nutrient requirements of domestic animals. Nutrient requirements of poultry.
34. Ortiz, A., Espino, J., Bejarano, I., Lozano, G. M., Monllor, F., García, J. F., ... and Rodríguez, A. B. (2011). High endogenous melatonin concentrations enhance sperm quality and short-term in vitro exposure to melatonin improves aspects of sperm motility. Journal of pineal research, 50(2): 132-139.
35. Reiter, R. J., Mayo, J. C., Tan, D. X., Sainz, R. M., Alatorre-Jimenez, M., and Qin, L. (2016). Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. Journal of pineal research, 61(3): 253-278.
36. Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Paredes, S. D., Mayo, J. C., and Sainz, R. M. (2009). Melatonin and reproduction revisited. Biology of reproduction, 81(3): 445-456.
37. Santiago-Moreno, J., and Blesbois, E. (2020). Functional aspects of seminal plasma in bird reproduction. International Journal of Molecular Sciences, 21(16): 5664.
38. SAS. (2012). Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA.
39. Smith, A. M. J., Bonato, M., Dzama, K., Malecki, I. A., and Cloete, S. W. P. (2018). Mineral profiling of ostrich (Struthio camelus) seminal plasma and its

relationship with semen traits and collection day. Animal reproduction science, 193: 98-106.

40. Suzen, S. (2018). Melatonin and its antiaging activity: new approaches and strategies for age-related disorders. Molecular Basis and Emerging Strategies for Anti-aging Interventions, 217-235.
41. Tan, D. X., Manchester, L. C., Terron, M. P., Flores, L. J., and Reiter, R. J. (2007). One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species?. Journal of pineal research, 42(1): 28-42.
42. Zaniboni, L., and Cerolini, S. (2009). Liquid storage of turkey semen: Changes in quality parameters, lipid composition and susceptibility to induced in vitro peroxidation in control, n-3 fatty acids and alpha-tocopherol rich spermatozoa. Animal reproduction science, 112(1-2): 51-65.