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

تأثير الطرد المركزي واضافة هرمون الميلاتونين للسائل المنوي على صفات البلازما المنوية في السائل المنوي المبرد للديكة المحلي العراقي

محمد علاء البيار* **مؤمن حمدي عطاالله**

كلية الزراعة ـ جامعة الانبار

***المراسلة الى:** محمد علاء البيار، قسم الانتاج الحيواني، كلية الزراعة، جامعة الانبار، الرمادي، العراق.
البريد الالكتروني: ag.mohammed.ala@uoanbar.edu.iq

Article info
Received: 2022-08-25
Accepted: 2022-09-24
Published: 2024-06-30

DOI-Crossref:
10.32649/ajas.2024.183750

Cite as:
Al-Bayar, M. A., and Attallah, M. H. (2024). Effect of centrifugation and addition of melatonin hormone to semen on characteristics of seminal plasma in cooled semen of Iraqi local roosters. Anbar Journal of Agricultural Sciences, 22(1): 517-527.

©Authors, 2024, 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 للمدة من 1/ كانون الاول /2021 ولغاية 2/ نيسان/ 2022 بهدف دراسة تأثير عملية خزن السائل المنوي بعد اجراء عملية طرد مركزي واستبدال البلازما المنوية بمخفف Lake (1960) المخصص لحفظ السائل المنوي مع إضافة هرمون الميلاتونين كمضاد للأكسدة. اجريت هذه الدراسة من خلال 40 ديك بعمر 33 اسبوع من الدجاج المحلي ضمن ظروف قياسية من درجة حرارة ورطوبة وتهوية وعليقة متوازنة. بعد جمع السائل المنوي، قسمت العينات الى خمس معاملات لكل معاملة ثلاث مكررات وحسب التالي: T1: معاملة السيطرة:T2 اضافة المخفف بنسبة (1:2) فقط T3: إضافة مخفف حاوي على هرمون الميلاتونين بتركيز ($1mMol.L^{-1}$) T4: استخدام الطرد المركزي مع اضافة المخفف بنسبة 1:2 فقط T5: استخدام الطرد المركزي مع اضافة مخفف حاوي على هرمون الميلاتونين بتركيز ($1\ mMol.L^{-1}$). واظهرت النتائج تفوق المعاملة T3 لصفات البلازما المنوية اذ انخفضت معنويا ($P<0.01$) بنسبة تركيز البروتين في البلازما للمعاملة T3 بعدة خزنه لمدة 72 ساعة وانخفاض معنوي ($P<0.01$) في نشاط انزيم GOT ضمن المعاملة T3 بالمقارنة مع بقية المعاملات بينما لم تسجل باقي المعاملات اي فروق معنوية. ونستنتج من ذلك ان اضافة هرمون الميلاتونين بتركيز ($1\ mMol.L^{-1}$) الى مخففات الحفظ ادى الى التحسين في صفات البلازما المنوية.

كلمات مفتاحية: بلازما منوية، طرد مركزي، هرمون الميلاتونين، حفظ بالتبريد، الدجاج المحلي.

EFFECT OF CENTRIFUGATION AND ADDITION OF MELATONIN HORMONE TO SEMEN ON CHARACTERISTICS OF SEMINAL PLASMA IN COOLED SEMEN OF IRAQI LOCAL ROOSTERS

M. A. Al-Bayar* **M. H. Attallah**

College of Agriculture- University Anbar

***Correspondence to:** M. A. Al-Bayar, Department of Animal Production, College of Agriculture, University of Anbar, Ramadi, Iraq.
Email: ag.mohammed.ala@uoanbar.edu.iq

Abstract

This experiment conducted in the poultry fields, Department of Animal Production / College of Agriculture, University of Anbar from 1 December 2021 to 2 April 2022 in order to study the effect of semen storage process after centrifugation and replacement of seminal plasma with Lake (1960) diluent to preserve semen with the addition of the hormone melatonin as an antioxidant. This study conducted on 40 roosters of 33 weeks old Iraqi native rooster domestic chickens under standard conditions of temperature, humidity, ventilation and a balanced diet. Semen collecting samples divided into five treatments, three replicates for each one as follows. T1: control, T2: adding diluent as (1:2) semen: diluent only T3: adding a diluent containing the hormone melatonin at a concentration (1 $mMol.L^{-1}$) T4: using Centrifuge with the addition of the dilution in the ratio (1:2) only T5: Use a centrifuge with the addition of a diluent containing the hormone melatonin at a concentration (1 $mMol.L^{-1}$). Results showed that superiority in T3 treatment for seminal plasma traits, as it decreased significantly ($P<0.01$) in the percentage of protein concentration in plasma for T3 with several storages for 72 hours. significant decrease ($P<0.01$) in GOT enzyme activity within the T3 treatment compared with treatments, While the rest of the treatment did not record any significant differences. We conclude from this that the addition of the melatonin hormone at a concentration of ($1mMol.L^{-1}$) to the preservation diluents led to an improvement in the characteristics of the seminal plasma.

Keywords: Seminal plasma, Centrifugation, Melatonin hormone, Cryopreservation, Local chicken.

المقدمة

يتكون السائل المنوي بشكل عام من الحيامن التي تسبح بسائل يدعى بالبلازما المنوية، في معظم أنواع الطيور يتميز السائل المنوي باحتوائه على تركيز عالي من الحيامن الناضجة ونسبة قليلة من الحيامن غير الناضجة ويتميز ايضا بحركة الحيامن السريعة وانخفاض في نسبة التشوهات المورفولوجية (5 و27). الدور الفسيولوجي لهذه الخلايا غير الناضجة في السائل المنوي غير معروف، لكنها قد تكون مسؤولة عن مستويات عالية من أنواع

الجذور الحرة (ROS) في البلازما المنوية. عادةً ما يحتوي السائل المنوي للطيور على تركيز عالي من الحيامن مع نسبة قليلة نسبًيا من البلازما المنوية (30). يؤدي تفاعل البلازما المنوية مع الحيامن إلى إحداث تغييرات أيضية وربط البروتينات المنوية على سطح خلية الحيامن وإعادة تشكيل الغشاء مما قد يؤثر على نقل الحيامن وتخزينها في الجهاز التناسلي الأنثوي وتكوين البيضة المخصبة (10 و14). في التزاوج الطبيعي يتم التخلص من البلازما المنوية عن طريق امتصاصها في مهبل الانثى بعد عملية التزاوج مباشرة (25). لكن اثناء استخدام الطرق المختبرية لخزن السائل المنوي الخاص بالدواجن في المختبر يظهر بشكل كبير التأثير الضار لمكونات البلازما المنوية وبالتالي يؤثر على عمليات الاخصاب للحيامن المخزونة لفترة طويلة (10 و25). وجد ان هنالك تأثيرات ضارة للبلازما المنوية على حيامن الدجاج والرومي اثناء عملية الخزن (9). اذ ان التفاعل ما بين البلازما المنوية والحيامن يزيد من التغيرات الايضية مما قد يؤدي ارتباط البروتينات الموجودة في البلازما المنوية على سطوح اغشية الحيامن مما قد يؤثر سلبا على عملية تخزين الحيامن في الجهاز التناسلي الانثوي وبالتالي حدوث انخفاض معنوي في نسبة الاخصاب (10 و14). كما بينت العديد من الدراسات الحديثة بان إضافة هرمون الميلاتونين كمضاد للأكسدة في مخففات السائل المنوي المخزون مدة 24 ساعة تحت درجة حرارة 5م° قد عزز من الحركة الفردية للحيامن وقلل من تشوهات الاكروسومات والنسبة المئوية للحيامن الميتة (3). كما تبين بان الطرد المركزي للسائل المنوي المخزون بالتبريد قد عزز من حيوية وحركة الحيامن نتيجة للتخلص من العوامل المؤكسدة في البلازما المنوية (4). ونتيجة لعدة دراسات حول تأثيرات مكونات البلازما المنوية في ايض وحيوية الحيامن وتأثيراتها في صفات السائل المنوي المخزون بالتبريد (26). 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 (16) وتأثيرها في خزن السائل المنوي مع إضافة الميلاتونين كمضاد للأكسدة كطريقة للتقليل من الاضرار التي تصيب الحيامن اثناء عملية الخزن بالتبريد عند درجة 5م°وتأثير هذه العمليات في نسبة الخصوبة والفقس.

المواد وطرائق العمل

اجريت هذه التجربة في حقول الدواجن التابعة لقسم الانتاج الحيواني/ كلية الزراعة جامعة الانبار في الرمادي. خلال المدة من 1/ كانون الاول /2021 ولغاية 2/ نيسان/ 2022 وذلك بتربية 40 ديك وبعمر 33 اسبوع من الدجاج المحلي العراقي. وتم توفير كافة المستلزمات الضرورية من حظائر ومختبرات وادوات لإجراء التجربة العلمية الخاصة بموضوع الدراسة. استخدمت ذكور الدجاج المحلي المرباة في حقل تجاري في مدينة حديثة ومن فقسة واحدة (بعمر 33 اسبوع) وربيت في قاعة مقسمة الى اقفاص (مساحة كل قفص 3*1.5م) وربيت الطيور بطريقة التربية الأرضية واستخدمت فرشة من نشارة الخشب بسمك 5 سم. تدريب الديوك على عملية جمع السائل المنوي ودارسة خصائص السائل المنوي لكل ديك على حدة، كذلك خضعت جميع الطيور لنظام غذائي موحد اذ تم تقديم عليقة متوازنة من جميع احتياجات الطيور من المواد الغذائية والعناصر المعدنية والفيتامينات وطبقا لما

ورد في تقارير مجلس البحث الوطني الامريكي (19). دربت الذكور لعملية جمع السائل المنوي لمدة 3 اسابيع عن طريق استخدام طريقة المساج الظهري البطني بواقع مرة واحدة لكل 3 ايام ولمدة 3 اسابيع لتعويد الطيور على اعطاء سائل منوي نظيف وبكمية مناسبة، 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 (1960) والذي تم تحضيره كما بين في الجدول 1.

جدول 1: 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 1 shows the chemical composition of semen diluent (Lake) used in the experiment.

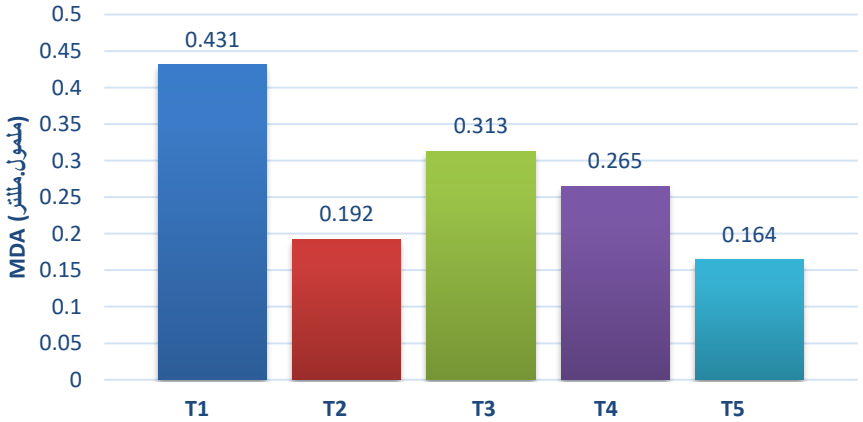
استخدم هرمون الميلاتونين النقي المصنع منقبل Sigma aldlich، إذ تم تذويب 1 غم من هرمون الميلاتونين الصناعي النقي في 100 مل من الماء المقطر وتحريكه جيدا لضمان ذوبان الهرمون بشكل كامل وبعدها تم اضافة المحلول على مكونات مخفف السائل المنوي وتذويبها حيث يصبح تركيز هرمون الميلاتونين في المخفف هو $100mMol.L^{-1}$ وفقا للمعادلة التالية: 1 mMol per L =4.6 gm per Dl (2).

اذ اصبح لدينا نوعين من المخفف نوع بدون اضافات ونوع اخر يحتوي على هرمون الميلاتونين بتركيز ($1mMol.L^{-1}$) وتم حفظه في مكان بارد وجاف وبعيدا عن الضوء وتم تجديد المخفف مرة كل تجربة طول فترة الدراسة وذلك لتجنب تلف المخفف و تمت عملية جمع السائل المنوي عن طريق استخدام طريقة المساج الظهري البطني Abdominal Massage وبالطريقة التي اشار اليها Burrows و Quinn (7) وعن طريق قيام شخصين بعملية الجمع، تم خزن السائل المنوي بالتبريد بعد تخفيفه بمخفف Lake الموضح مكوناته في جدول 1 (اعتمادا على تركيز النطف 100 مليون نطفة في كل مل من السائل المنوي المخفف) وقسمت المعاملات كالاتي: (T1) تمثل مجموعة السيطرة اي بدون طرد مركزي وبدون اضافة اي مخفف، (T2) اضافة المخفف فقط بدون هرمون الميلاتونين بنسبة 1:2 الى السائل المنوي وبدون اجراء الطرد المركزي، (T3) اضافة المخفف مع هرمون الميلاتونين ($1 mMol.L^{-1}$) بنسبة 1:2 الى السائل المنوي وبدون عملية الطرد المركزي للسائل المنوي، (T4) فصلت البلازما المنوية عن الحيامن بواسطة عملية الطرد المركزي وعوض عن البلازما المنوية التي تم عزلها بنسبة مساوية من المخفف فقط بنسبة 1:2 الى السائل المنوي، (T5) تم اجراء عملية الطرد المركزي للسائل المنوي التعويض عن البلازما المنوية التي عزلت بنسبة مساوية من المخفف الحاوي على هرمون الميلاتونين بنسبة 1:2 الى السائل المنوي وبعد تقسيم المعاملات وضع العينات في انابيب اختبار محكمة الغلق (Eppendorf) لتجنب تعرضها للتأثيرات الخارجية او دخول قطرات الماء. وضعت كل انبوبة في علبة بلاستيكية حاوية على ماء بدرجة حرارة 32 مْ وتم وضعها مباشرة في الثلاجة وبدرجة حرارة 5 مْ مع وضع محرار زئبقي

ومراقبة عملية هبوط درجات الحرارة لحين الوصول الى درجة الحرارة 5 مْ واحتاجت هذه العملية 90 دقيقة للوصول الى درجة الجرارة المطلوبة. فصلت البلازما المنوية عن السائل المنوي بعد 72 ساعة من الخزن وذلك بوضع انابيب السائل المنوي المخزونة في جهاز الطرد المركزي وضبط الجهاز على سرعة 3000 دورة في الدقيقة ولمدة 10 دقائق، وجمع الجزء العلوي غير المترسب من النموذج والذي يمثل البلازما المنوية والذي يكون خاليا من الحيامن، وتم تقدير كل من الصفات التالية: تركيز الكلوكوز حسب الطريقة التي اعتمدتها شركة (Linear) المنتجة للعدة (kit) الخاصة بالقياس كما تم قياس تركيز البروتين الكلي في البلازما المنوية اعتماداً على طريقة (Biuret) التي أشار إليها Wooton و Freeman (31) وباستخدام العدة (Kit) الخاصة بالشركة المنتجة (Linear) وتعتمد هذه الطريقة على تفاعل ايونات النحاس في الوسط القاعدي مع الاواصر الببتيدية البروتينية وينتج عنها مركب معقد اللون. كما تم قياس تركيز (Malondialaehyde) (MDA) في البلازما المنوية عن طريق تقدير قيمة حامض الثايوباربيوتيرك (Thiobarbutiric acid TBA – Tri–chloral acetic acid TCA) اعتمادا على الطريقة التي وصفها Kumaresan واخرون (15). وتم قياس نشاط انزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline Phosphatase حسب طريقة Kind و King (15) لقياس نشاط انزيم الفوسفاتيز القاعدي في البلازما المنوية، واستعملت عدة (Kit) القياس المنتجة من شركة (Linear). وتم تقدير نشاط إنزيمات Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) و Glutamate pyruvate transaminase (GPT) حسب الطريقة المتبعة من قبل Reitman و Frankel (24) لقياس نشاط الانزيمين في البلازما المنوية، واستخدم عدة (Kit) القياس المنتجة من شركة (Linear) وبالنسبة لتقدير نشاط انزيم GPT فقد استخدمت الطريقة نفسها أعلاه مع اختلاف المحلول المنظم للأنزيم بوجود L-alanine بدلاً من L-aspartate وتسقط القراءة على منحني قياسي لل GPT لاستخراج فعالية الانزيم على وفق ما اشار اليه Reitman و Frankel (24).

النتائج والمناقشة

تشير الجداول في شكل 1 الى عدم وجود فروقات معنوية لتركيز MDA ما بين معاملات التجربة في البلازما المنوية بعد 72 ساعة حفظ بالتبريد تحت درجة حرارة 5 م°.



شكل 1: تأثير استخدام الطرد المركزي وهرمون الميلاتونين في تركيز المالونداياالديهايد (MAD) في البلازما المنوية بعد 72 ساعة حفظ بالتبريد تحت درجة حرارة 5 م°.

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.

Figure 1 show no significant differences among treatments in MDA concentration after semen storage at 5c° for 72 hours.

كما يبين الجدول 2 وجود انخفاض معنوي ($P\leq0.01$) بتركيز البروتين في البلازما المنوية بعد 72 ساعة حفظ تحت درجة حرارة 5 م° ضمن المعاملات التجربة اذ اعطت T4 افضل نتيجة اذ اعطت اقل تركيز للبروتين اذ بلغت (29.33 غم. 100 مل$^{-1}$) مقارنة مع باقي المعاملات، وسجل اعلى تركيز للبروتين ضمن المعاملة T2 و(48.89 T5، 48.51 غم. 100 مل$^{-1}$) مقارنة مع بقية المعاملات. ولم تكن هنالك اي فروق معنوية بين المعاملات التجربة لتركيز الكلوكوز.

جدول 2: تأثير استخدام الطرد المركزي وهرمون الميلاتونين على تركيز الكلوكوز وتركيز البروتين وتركيز المالونداياليديهايد (MAD) في البلازما المنوية بعد 72 ساعة حفظ تحت درجة حرارة 5 م°.

المعاملات	صفات البلازما المنوية بعد 72 ساعة حفظ	
	تركيز الكلوكوز (ملغم. 100 مل$^{-1}$)	تركيز البروتين (غم. 100 مل$^{-1}$)
T1	229.19±17.89(1) A	41.44±5.86 AB
T2	216.65±25.93 A	48.89±6.50 A
T3	205.96±25.62 A	40.06±3.29 AB
T4	188.07±26.73 A	29.33±5.59 B
T5	227.08±23.28 A	48.51±5.84 A
مستوى المعنوية	N.S	**

A, B: الحروف المختلفة ضمن الصف الواحد تشير إلى وجود فروق معنوية بين المعاملات عند مستوى معنوية ($P\leq0.01$)
(1) المتوسط± الخطأ القياسي)
الفروق المعنوية تشير الى وجود فروق معنوية بين المعاملات الخمسة
***و** تمثل الفروق المعنوية عند ($P<0.01$). N.S تشير الى عدم وجود فروق معنوية.**
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 .

In table 2 there is a significant differences ($P\leq0.01$) in seminal plasma protein concentration after 72 hours of storage within the experimental treatments. T4 gave the best result as it gave the lowest concentration of protein reaching (29.33 g. 100 ml^{-1}) compared to others, and the highest protein concentration was recorded within treatment T2 and T5 (48.89, 48.51 g. 100 ml^{-1}) compared to the rest of the treatments. No significant differences between Treatments in concentrations of glucose and MDA.

قد يعود السبب في ارتفاع نسبة البروتين الكلي لكل من T2 وT5 الى زيادة نسبة الحيامن المشوهة والحيامن الميتة لهذا المعاملات (بيانات غير منشورة)، اذ تزداد نسبة البروتين في البلازما المنوية في السائل المنوي للرومي مع زيادة نسبة التشوهات الكلية للحيامن والحيامن الميتة (28). وتؤثر نسبة البروتين العالية سلبا في تفاعل الحيامن عند الاندماج مع البويضة (29). فضلا عن وجود بعض البروتينات المهمة لحركة الحيامن، لكن أظهرت الدراسات السابقة بأن metalloproteinase domain- وتشارك بروتينات البلازما المنوية في العديد من الخطوات الأساسية التي تسبق الإخصاب مثل القدرة على الاخصاب وتأسيس مخازن للسائل المنوي في قناة البيض وتعديل الاستجابة المناعية للرحم ونقل الحيامن إلى موقع الإخصاب. ويعمل transient receptor potential cation

channel subfamily V member 6 (TRPV6) على تنظيم نقل الكالسيوم اذ يؤثر تركيز الكالسيوم على نضج الحيامن والكالسيوم ويعد عامل مهم في حركة الحيامن (18 و28). إضافة الى دور بروتين zinc transporter 4 (SLC30A4) الذي يعمل على نقل الزنك إلى الحيامن أو يتحكم في تركيز الزنك في البلازما المنوية، اذ أن الزنك يعد عامل مساعد لأكثر من 200 من الإنزيمات المعدنية فضلا عن تأثير الزنك في استهلاك الأكسجين للحيامن في البلازما المنوية (11) وحركة الحيامن (8). كما ان البلازما المنوية حاوية على بروتينات قد تؤثر على قدرة البقاء في البرد اثناء الحفظ بالتبريد وتمنع 27 شكلا من اشكال التغير المورفولوجي والفسيولوجي للحيامن والإبقاء على قدرتها على الاخصاب بعد عمليات التجميد والاذابة (3). وهذا يشير الى ان ارتفاع تركيز البروتين يدلل الى ارتفاع نسبة الحيامن المشوهة ونسبة الحيامن الميتة والتي تكون مصدر للبروتين في البلازما المنوية نتيجة لموت الحيامن وتحللها.

يبين الجدول 3 وجد فروق معنوية في نشاط انزيم (GOT) في البلازما المنوية بعد 72 ساعة حفظ اذ يلاحظ من الجدول وجود ارتفاع معنوي ($P<0.01$) في نشاط انزيم (GOT) بين المعاملات التجربة اذ بلغت اعلى قيمة لنشاط الانزيم ضمن المعاملة T2, T1 اذ بلغت (10.40,9.20 وحدة دولية. لتر$^{-1}$) بينما كانت افضل النتائج ضمن المعاملة T3 اذ بلغت اقل قيمة لنشاط الانزيم اذ بلغت (7.20 وحدة دولية. لتر$^{-1}$). بينما لم تكن هنالك اي فروق معنوية ضمن المعاملات الخمسة لنشاط انزيم الفوسفاتيز القاعدي (ALP) ونشاط انزيم (GPT).

جدول 3: تأثير استخدام الطرد المركزي وهرمون الميلاتونين على نشاط انزيم الفوسفاتيز القاعدي (ALP) ونشاط انزيم (GPT) ونشاط انزيم (GOT) في البلازما المنوية بعد 72 ساعة حفظ تحت درجة حرارة 5 م°.

المعاملات	صفات البلازما المنوية بعد 72 ساعة حفظ		
	نشاط انزيم الفوسفاتيز القاعدي ALP (وحدة كنك ارمسترونك)	نشاط أنزيم GPT (وحدة دولية. لتر$^{-1}$)	نشاط أنزيم GOT (وحدة دولية . لتر$^{-1}$)
T1	79.00±17.77 A	8.60±1.63 A	9.20±0.73 A
T2	71.40±26.90 A	8.60±0.92 A	10.40±0.60 A
T3	63.20±18.16 A	11.20±0.82 A	7.20±0.58 B
T4	53.40±18.70 A	9.80±1.71 A	9.80±1.46 AB
T5	65.80±17.87 A	11.00±1.84 A	9.60±1.02 AB
مستوى المعنوية	N.S	N.S	**

A, B: الحروف المختلفة ضمن الصف الواحد تشير إلى وجود فروق معنوية بين المعاملات عند مستوى معنوية ($P\leq0.01$)
(1)المتوسط± الخطأ القياسي)
الفروق المعنوية تشير الى وجود فروق معنوية بين المعاملات الخمسة
***و** تمثل الفروق المعنوية عند ($P<0.01$). N.S تشير الى عدم وجود فروق معنوية.**
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 .

Table 3 shows that there were significant differences in GOT enzyme activity of seminal plasma after 72 hours of preservation. Significant increase ($P<0.01$) in GOT enzyme activity between the experimental treatments, highest enzyme activity value reached within Treatment T1, T2 (9.20, 10.40 international units. Liter^{-1}), while the best results were within treatment T3, which reached the lowest value of enzyme activity, (7.20 international units. Liter^{-1}). While there were no significant differences among treatments in alkaline phosphatase ALP and GPT activity.

ان الارتفاع المعنوي في نشاط انزيم GOT في كل من المعاملة T1 وT2 وقد يعزى الى الضرر الذي تعرضت له الحيامن اثناء الحفظ بالتبريد وارتفاع نسبة الحيامن الميتة والمشوهة وكذلك تعرض اغشية بلازما الحيامن للضرر مما يزيد من تسرب البروتينات والتغير في طبيعتها والتشوه الهيكلي لعضيات الخلية اذ ان هذ التدهور اثناء الخزن يؤثر في جودة السائل المنوي. هذه النتائج يتفق مع Partyka واخرون (21) الذين بينوا بان تأثير حفظ السائل المنوي للدجاج على نشاط هذه الانزيمات وبيروكسيد الدهون وصفات جودة السائل المنوي، اذ من المعروف بأن عملية التبريد تؤدي إلى إصابة كبيرة بالبنية الخلوية مثل غشاء البلازما والنواة والميتوكوندريا والذيل (6 و22). اذ ان الأغشية الخلوية هي أحد المواقع الرئيسية للإصابة أثناء التبريد والتجميد والاذابة لاحقاً كما بين (1 و20) بأن هذا الضرر ناتج عن تكوين بيروكسيد الدهون مما يقلل من سلامة الغشاء البلازمي للحيامن وذلك لان حفظ السائل المنوي بالتبريد يزيد من انتاج الجذور الحرة ROS وهذ يتفق مع Partyka واخرون (21) الذين بينوا بان حفظ السائل المنوي للديكة بالتبريد أدى إلى خفض نسبة الحايمن الحية والغير مشوهة وتدهور في سلامة غشاء البلازما إلى 37.3% ورافق ذلك زيادة في تركيز بيروكسيدات الدهون وهذا يتفق مع النتائج الواضحة للمعاملة T3 اذ كان هنالك انخفاض في نشاط انزيم GOT مقارنة بمعاملة السيطرة ويعزى هذا الى دور هرمون الميلاتونين كمضاد اكسدة في حماية الحيامن من الضرر التي تسببها الجذور الحرة ROS، اذ يمكن للميلاتونين تنشيط الجينات المضادة لموت الخلايا المبرمج (bcl−xL family) and bcl−2) bcl2l1 والخفض من نشاط الجينات المحفزة لموت الخلايا المبرمج (bax) (17). أن مستقبلات الميلاتونين التي تتشكل عندما يعمل الهرمون كعامل كاسح للجذور الحرة وهي مماثلة أو أفضل مضادات الاكسدة الأصلية في ازالة جذور الأوكسجين والنيتروجين الحرة (ROS، RNS) (12).

الاستنتاجات

ان استخدام الطرد المركزي لعزل البلازما المنوية عن الحيامن وعدم اضافة هرمون الميلاتونين كمضاد اكسدة ادى الى انخفاض في صفات جودة السائل المنوي وان مخفف Lake (1960) لم يعوض عن البلازما المنوية بعد عزلها عن السائل المنوي للديكة لان نقص المخفف بالمواد العضوية والغير العضوية مثل المعادن اثر في جودة السائل المنوي.

Supplementary Materials:

No Supplementary Materials.

Author Contributions:

Author 1; writing original draft preparation, Author 2; methodology, Lab. Analysis, check all figures, draw figure, read and rewrite some figures then agreed to the published version of the manuscript.

Funding:

This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement:

The study was conducted accordance to Central Ethics Committee, University of Anbar.

Informed Consent Statement:

No Informed Consent Statement.

Data Availability Statement:

Data Availability Statement.

Conflicts of Interest:

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments:

The authors are thankful for the help of the Head of Animal production Dept. The College of Agriculture, University of Anbar, Iraq and poultry field team for supporting helps all time of this study.

Disclaimer/Journal's Note:

The statements, opinions, and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of AJAS and/or the editor(s). AJAS and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions, or products referred to in the content.

المصادر

1. Abdulwahid, A. S., Mohammed, A. B., and Al-Mjbel, A. A. (2022). Onion (Allium cepa) and sumac (Rhus coriaria) powder as dietary supplements for Japanese quail (Coturnix japonica): effect on egg production, blood parameters and antioxidant activity. https://doi.org/10.17957/IJAB/15.1964.
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. DOI: 10.35124/bca.2019.19.2.2971.
3. Al-Essawe, E. M., Wallgren, M., Wulf, M., Aurich, C., Macías-García, B., Sjunnesson, Y., and Morrell, J. M. (2018). Seminal plasma influences the fertilizing potential of cryopreserved stallion sperm. Theriogenology, 115: 99-107. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.021.
4. Attallah, M. H., and Al-Bayar, M. A. (2023). Effect of centrifugation and Melatonin hormone on cooled semen characteristics of Iraqi local roosters. Sciences, 12(2): 643-655.
5. Blesbois, E. (2012). Biological features of the avian male gamete and their application to biotechnology of conservation. The Journal of Poultry Science, 49(3): 141-149. https://doi.org/10.2141/jpsa.011120.
6. Blesbois, E., Grasseau, I., and Seigneurin, F. (2005). Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. Reproduction, 129(3): 371-378. https://doi.org/10.1530/rep.1.00454.
7. Burrows, W. H., and Quinn, J. P. (1937). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. Poultry science, 16(1): 19-24. https://doi.org/10.3382/ps.0160019.
8. Chia, S. E., Ong, C. N., Chua, L. H., Ho, L. M., and Tay, S. K. (2000). Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm

parameters between fertile and infertile men. Journal of andrology, 21(1): 53-57. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03275.x.

9. Douard, V., Hermier, D., and Blesbois, E. (2000). Changes in turkey semen lipids during liquid in vitro storage. Biology of reproduction, 63(5): 1450-1456. https://doi.org/10.1095/biolreprod63.5.1450.
10. Druart, X., and de Graaf, S. (2018). Seminal plasma proteomes and sperm fertility. Animal reproduction science, 194: 33-40. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.04.061.
11. Eliasson, R., Johnsen, Ø., and Lindholmer, C. (1971). Effect of zinc on human sperm respiration. Life Sciences, 10(22): 1317-1320. https://doi.org/10.1016/0024-3205(71)90331-6.
12. Galano, A., Tan, D. X., and Reiter, R. J. (2013). On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. Journal of pineal research, 54(3): 245-257. https://doi.org/10.1111/jpi.12010.
13. Kind, P. R. N., and King, E. (1954). Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolysed phenol with amino-antipyrine. Journal of clinical Pathology, 7(4): 322–326. https://doi.org/10.1136%2Fjcp.7.4.322.
14. 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. https://doi.org/10.2174/0929866526666190208112152.
15. Kumaresan, A., Ansari, M. R., and Garg, A. (2005). Modulation of post-thaw sperm functions with oviductal proteins in buffaloes. Animal reproduction science, 90(1-2): 73-84. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.01.009.
16. Lake, P. E. (1960). Studies on the dilution and storage of fowl semen. Reproduction, 1(1): 30-35. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0010030.
17. Len, J. S., Koh, W. S. D., and Tan, S. X. (2019). The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. Bioscience reports, 39(8): BSR20191601. https://doi.org/10.1042/BSR20191601.
18. Mohammed, A. B., Hamad, O. K., and Khttab, T. A. (2023). Effect of zinc oxide nanoparticles in drinking water on growth rate, biochemical parameters, and intestinal histology of broilers. Advances in Agriculture, 2023(1): 8523516. https://doi.org/10.1155/2023/8523516.
19. Mirzan, N. A., Khudhair, M. Y., and Rashid, R. M. (2024). Chemical and oxidative stability of lamb and turkey kaurma with beeswax as a fat replacer during cold storage in Kurdistan Iraq. Journal of Life Science and Applied Research, 5(1): 1-7. https://doi.org/10.59807/jlsar.v5i1.92.
20. National Research Council. (1994). Nutrient Requirements of Poultry, 9th rev. ed. National Academy Press, Washington, D.C.
21. Partyka, A., Łukaszewicz, E., and Niżański, W. (2012). Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. Theriogenology, 77(8): 1497-1504. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.006.

22. Partyka, A., Niżański, W., and Łukaszewicz, E. (2010). Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry. Theriogenology, 74(6): 1019-1027. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.04.032.
23. Publicover, S., Harper, C. V., and Barratt, C. (2007). [Ca2+] i signalling in sperm—making the most of what you've got. Nature cell biology, 9(3): 235-242. https://doi.org/10.1038/ncb0307-235.
24. Reitman, S., and Frankel, S. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. American journal of clinical pathology, 28(1): 56-63. https://doi.org/10.1093/ajcp/28.1.56.
25. Santiago-Moreno, J., and Blesbois, E. (2020). Functional aspects of seminal plasma in bird reproduction. International Journal of Molecular Sciences, 21(16): 5664. https://doi.org/10.3390/ijms21165664.
26. Santiago-Moreno, J., Bernal, B., Pérez-Cerezales, S., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Esteso, M. C., ... and Blesbois, E. (2019). Seminal plasma amino acid profile in different breeds of chicken: Role of seminal plasma on sperm cryoresistance. PloS one, 14(1): e0209910. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209910.
27. Santiago-Moreno, J., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Esteso, M. C., López-Sebastián, A., Gañán, N., ... and Blesbois, E. (2015). Characterization of red-legged partridge (Alectoris rufa) sperm: seasonal changes and influence of genetic purity. Poultry science, 94(1): 80-87. https://doi.org/10.3382/ps/peu020.
28. Thurston, R. J. (1976). Physiological studies of semen production in the domestic turkey. PhD Thesis, University of Missouri, Columbia.
29. Töpfer-Petersen, E., Ekhlasi-Hundrieser, M., Kirchhoff, C., Leeb, T., and Sieme, H. (2005). The role of stallion seminal proteins in fertilisation. Animal Reproduction Science, 89(1-4): 159-170. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.018.
30. Villaverde-Morcillo, S., Soler, A. J., Esteso, M. C., Castaño, C., Miñano-Berna, A., González, F., and Santiago-Moreno, J. (2017). Immature and mature sperm morphometry in fresh and frozen-thawed falcon ejaculates. Theriogenology, 98: 94-100. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.051.
31. Wootton, I. D. P. and Freeman, H. (1982). Microanalysis in medical biochemistry, 6th Ed., Churchill Livingstone Inc. NY, USA. PP. 1-190.