The effect of melatonin on kinetic parameters of Awassi ram sperm during cooling at +4°C using the sperm analysis system (CASA)

Jaafar Abd Alhamid[*]
Dr. Ali Nisafi[**]
Dr. Zouher Jabbour[***]
Dr. Bushra Alissa[****]

(Received 10 / 6 / 2025. Accepted 30 / 12 /2025)

□ ABSTRACT □

This study was conducted to test the effect of adding melatonin as an antioxidant to the semen dilution medium of Awassi rams. Semen was collected from five rams using the electroejaculation method. The samples were transported directly to the laboratory, and melatonin was added to Tris Egg yolk diluent in different concentrations {0.5(M1), 1(M2), 1.5(M3)} mM, and stored at +4°C for 72 hours. Kinetic parameters were evaluated using the CASA system after (24, 48,72) hours. The results showed that all treatments significantly (P<0.001) outperformed the control (M0) in the progressive motility, total motility, and rapid motility. The average percentages of progressive motility of sperm for treatments M1, M2, M3, and M0 were (53.03, 66.90, 64.63, and 44.85%), respectively. Treatment M2 significantly outperformed the control and other treatments (P<0.001) in sperm velocity parameters: VCL (curved velocity), VSL (linear velocity), and VAP (average path velocity). The mean sperm velocity for curvilinear velocity for treatments M1, M2, M3, and the control were (76.05, 88.38, 84.64, and 68.58 microns/s), respectively. It has been shown that adding melatonin as an antioxidant to the semen diluent of rams contributed to maintaining sperm quality during cooling at +4°C. Given that the 1 mM concentration outperformed all parameters, we recommend adding melatonin at a 1 mM.

Keywords: Melatonin, antioxidant, CASA, sperm.

Copyright **:**Latakia University journal (formerly Tishreen) -Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

[*] **Master student, Faculty of Agricultural Engineering, Latakia University(formerly Tishreen), Latakia, Syria. Jaafar.abdalhamid@tishreen.edu.sy**
**** Professor, Faculty of Agricultural Engineering, Latakia University (formerly Tishreen), Latakia, Syria. dr.ali.nisafi@gmail.com**
***** Associate Professor, Faculty of Agricultural Engineering, Latakia University (formerly Tishreen), Latakia, Syria. jabourz@yahoo.com**
****** Associate Professor,Faculty of Agricultural Engineering, Latakia University (formerly Tishreen), Latakia, Syria. bushraalissa@gmail.com**

تأثير الميلاتونين في مؤشرات الحركة والسرعة لنطاف كباش العواس أثناء الحفظ بالتبريد عند الدرجة +4° باستخدام نظام تحليل النطاف CASA

جعفر عبد الحميد *
د علي نيصافي **
د. زهير جبور ***
د. بشرى العيسى ****

(تاريخ الإيداع 10 / 6 / 2025. قبل للنشر في 30 / 12 / 2025)

ملخّص

أجريت هذه الدراسة بهدف اختبار أثر إضافة هرمون الميلاتونين كمضاد أكسدة إلى وسط تمديد السائل المنوي لكباش العواس. جمع السائل المنوي من خمسة كباش باستخدام القاذف الكهربائي. تم نقل العينات مباشرةً إلى المخبر، وأضيف وسط التمديد Tris المكمل بالميلاتونين وفقاً للتراكيز [(M1)0.5، (M2)1، (M3)1.5] ميلي مولار، وحفظ في المبرد على درجة حرارة +4 مئوية لمدة 72 ساعة. تم قراءة مؤشرات الحركة والسرعة باستخدام جهاز CASA بعد (24، 48، 72) ساعة. بينت النتائج تفوق جميع المعاملات معنوياً (P<0.001) على الشاهد (M0) في مؤشر الحركة التقدمية، والحركة الكلية، والحركة السريعة، فقد بلغ متوسط النسبة المئوية للحركة التقدمية للنطاف لكل من المعاملات M1، M2، M3، M0 (53.03، 66.90، 64.63، 44.85%) على التوالي. تفوقت المعاملة M2 معنوياً (P<0.001) على الشاهد وبقية المعاملات في مؤشرات سرعة النطاف VCL السرعة المنحنية، VSL السرعة الخطية، VAP معدل سرعة المسار. فقد بلغ متوسط سرعة النطاف للسرعة المنحنية للمعاملات M1، M2، M3، والشاهد (76.05، 88.38، 84.64، 68.58 ميكرون/ثانية) على التوالي. يتبين أن إضافة الميلاتونين كمضاد أكسدة إلى وسط تمديد السائل المنوي للكباش أسهم في الحفاظ على جودة النطاف أثناء الحفظ بالتبريد على درجة حرارة +4، ونظراً لتفوق التركيز 1 ميلي مولار على جميع المعاملات في أغلب المؤشرات نوصي بإضافة الميلاتونين بتركيز 1 ميلي مولار.

الكلمات المفتاحية: الميلاتونين، مضاد أكسدة، CASA، النطاف.

حقوق النشر : مجلة جامعة اللاذقية (تشرين سابقاً)– سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

* طالب ماجستير، كلية الهندسة الزراعية – جامعة اللاذقية (تشرين سابقاً) – اللاذقية – سوريا. Jaafar.abdalhamid@tishreen.edu.sy
** أستاذ– كلية الهندسة الزراعية – جامعة اللاذقية(تشرين سابقاً) – اللاذقية – سوريا. dr.ali.nisafi@gmail.com
*** أستاذ مساعد– كلية الهندسة الزراعية – جامعة اللاذقية(تشرين سابقاً) – اللاذقية – سوريا. jabourz@yahoo.com
**** أستاذ مساعد– كلية الهندسة الزراعية – جامعة اللاذقية(تشرين سابقاً) – اللاذقية – سوريا. bushraalissa@gmail.com

مقدمة:

يعد السائل المنوي للكباش أكثر حساسية لعملية الحفظ بالتبريد وينتج المزيد من (ROS) reactive oxygen species الصيغ الأوكسجينية النشطة، وبيروكسيد الدهون lipid peroxidation (LPO)، مما يتسبب في تعرض النطاف للخطر [3]، وهذه المستويات العالية من (ROS) تلحق الضرر بالجزيئات الحيوية للنطاف مثل الدهون، والبروتينات، والحمض النووي. وتعزز التغيرات في سيولة الغشاء، وبالتالي التأثير في حركة النطاف [4]. يحتوي السائل المنوي للمجترات على مضادات الأكسدة التي يمكن أن تعوض بيروكسيد الدهون [5]، ومع ذلك قد تكون هذه الكفاءة المضادة للأكسدة الداخلية للسائل المنوي غير كافية لمنع بيروكسيد الدهون أثناء الحفظ بالتبريد لفترات طويلة [6]. إلى جانب ذلك، فإن تمديد السائل المنوي يقلل من قدرة مضادات الأكسدة في البلازما المنوية بشكل أكبر [7]. لذلك أصبح الحفاظ على النطف للكباش، وقدرتها على الإخصاب أثناء الحفظ بالتبريد محور تركيز الأبحاث الحديثة [8]. مهد هذا الوضع الطريق لإدراج مضادات الأكسدة في وسط تمديد السائل المنوي لزيادة مدة حفظ النطاف من خلال الحد من إنتاج (ROS) و(LPO) الزائد أثناء حفظ السائل المنوي [9]. يعد الإجهاد التأكسدي من التفاعلات الاستقلابية التي تستخدم الأوكسجين، فقد تطور نظام معقد من الدفاعات المضادة للأكسدة التي تحافظ بشكل عام على توازن هذه التفاعلات. ومع ذلك، في بعض الأحيان يمكن أن يختل هذا التوازن، مما يؤدي إلى الإجهاد التأكسدي بسبب التأثيرات المتعددة والمتنوعة التي يمكن أن تحدثها سمية الأكسجين على الخلية، فإن أفضل تعريف للإجهاد التأكسدي هو اختلال في التوازن بين مولدات الأكسدة ومضادات الأكسدة في الكائن الحي لصالح مولدات الأكسدة، وهذا يسبب أضراراً بالجزيئات البيولوجية [10]، ويعد مفهوم التوازن بين مولدات الأكسدة ومضادات الأكسدة أمراً أساسياً لفهم الإجهاد التأكسدي لعدة أسباب: قد يحدث الاضطراب من خلال التغيرات على جانبي التوازن (على سبيل المثال، توليد عالٍ بشكل غير طبيعي من الصيغ الأكسجينية النشطة أو نقص في مضادات الأكسدة)، ويسلط الضوء على تراكيز الاستتباب من (ROS). على الرغم من أن الصيغ الأكسجينية النشطة لفتت انتباه علماء الأحياء لأول مرة كمنتجات ثانوية ضارة محتملة لعملية التمثيل الغذائي الهوائي، فمن المسلم به الآن أنها تؤدي أدواراً مهمة كرسائل ثانوية في العديد من مسارات الإشارات داخل الخلايا [11]. يعتبر حفظ السائل المنوي لفترة طويلة مشكلة قابلة للبحث لأن السائل المنوي للكباش المحفوظ في درجة حرارة منخفضة جداً يعرض النطاف للتلف ويخفض قدرتها على إخصاب البويضات مقارنة بالحفظ السائل. لذلك ينصح باستخدام السائل المنوي المبرد السائل في غضون 24 ساعة بعد جمع السائل المنوي لتحقيق معدلات حمل أفضل [12]. يفرض هذا البروتوكول على الباحثين العمل على حفظ السائل المنوي عند 4 درجات مئوية كبديل غير مكلف، ويحافظ على جودة السائل المنوي بالمقارنة مع أنواع التثييات الأخرى [13]. أثناء حفظ السائل المنوي، قد يفقد جودته بنسبة 40٪ إلى 50٪ بسبب التكوين الزائد من (ROS) مما يؤدي إلى الإجهاد التأكسدي، وقد أفادت العديد من الدراسات أن الميلاتونين لديه القدرة على مواجهة الجذور الحرة وتقليل تراكيز(ROS) أثناء حفظ السائل المنوي، وبالتالي تقليل موت الخلايا الناجم عن الإجهاد التأكسدي خلال هذه العملية، يتم إنشاء مستقلبات الميلاتونين melatonin metabolites والتي ثبت أيضاً أن لديها قدرة مضادة للأكسدة، وتساعد في إبطال الجذور الحرة، وأحياناً بشكل أسرع من الميلاتونين [14]. لهرمون الميلاتونين خصائص محبة للدهون، وبالتالي يمكنه بسهولة عبور غشاء بلازما النطاف والموجودة في العصارة الخلوية cytosol والميتوكوندريا والنوى وفي سوائل الجسم الأخرى، كما يتفاعل الميلاتونين مع طبقات ثنائية الدهون في الميتوكوندريا، ويستقر في الغشاء ويمنع تسرب الإنزيمات داخل الخلايا (alanine transaminase، aspartate transaminase)، مما يؤدي إلى

خفض malondialdehyde (MDA) {أحد المنتجات النهائية لبيروكسيد الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة في الخلايا}، وزيادة إجمالي قدرة مضادات الأكسدة، وبالتالي تقليل الإجهاد التأكسدي في السائل المنوي [15]. أيضاً يتفاعل الميلاتونين مع الكالمودولين (بروتين رابط للكالسيوم)، وهو منظم داخل الخلايا لوظائف $Ca2+$ في النطاف مما يؤدي إلى تحسن في حركة النطاف المجمدة المذابة وسرعتها [16].

أهمية البحث و أهدافه:

تكمن أهمية البحث من حيث أن عملية حفظ السائل المنوي عند 4 درجة مئوية تعتبر بديلاً غير مكلف ويحافظ على جودة النطاف لفترة قصيرة قد تصل إلى 72 ساعة لتحقيق معدلات حمل أفضل، لأن السائل المنوي للكباش المحفوظ في درجة حرارة منخفضة جداً يعرض النطاف للتلف، ويخفض قدرتها على إخصاب البويضات مقارنة بالحفظ بالتبريد. لذا تتركز أهداف البحث في دراسة تقنية حفظ السائل المنوي بالتبريد في بعض مواصفات السائل المنوي لكباش العواس من خلال تقييم تأثير إضافة هرمون الميلاتونين بتراكيز مختلفة إلى محلول التمديد (yolk –egg –Fructose –Tris) في بعض مواصفات السائل المنوي لكباش العواس المحفوظ بالتبريد بوساطة CASA.

طرائق البحث ومواده:

مكان وزمان البحث: تم إجراء البحث في محطة بحوث دير الحجر التابعة للهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية في مخبر نقل الأجنة خلال شهر تشرين أول عام 2024.

جمع السائل المنوي وتمديده:

تم جمع السائل المنوي باستخدام القاذف الكهربائي (Minitub electro ejaculator e320، Minitub، Tiefenbach، Germany) من خمسة كباش عواس بأعمار (2–4 سنوات) مرباة في حظيرة مفتوحة ملحقة بمسرح تابعة لوحدة بحوث الأغنام والمراعي– الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، طُبقت فيها التدابير الصحية المناسبة من وقاية ومعالجة من الطفيليات الداخلية والخارجية، وتخضع الكباش لنظام تغذية متوازن من خلطة علفية مكونة من الشعير والصويا والنخالة بمعدل 1500 غ للرأس الواحد يومياً، النسب لكل كيلو غرام (0.65 كغ شعير+ 0.15 كغ صويا + 0.2 كغ نخالة)، بالإضافة إلى 0.75 كغ تبن و1% أملاح و1% فيتامينات، وتخرج إلى المرعى مدة ساعتين صباحاً وساعتين مساءً ويقدم الماء لها بشكل حر. نقلت العينات إلى المخبر مباشرةً بعد الجمع تفادياً لحدوث صدمة حرارية أو تلوث للعينة، تم قياس حجم القذفة باستخدام أنبوبة جمع زجاجية مخروطية الشكل ومدرجة لأقرب 0.1، وأخذت قراءة أحجام كل قذفة، وقبول الحجم بين (0.6–2) ml، وبلون طبيعي (أبيض حليبي) خالي من الدم والشوائب. فُحصت كل عينة مباشرةً باستخدام المجهر الضوئي لفحص الحركة الكلية الموجية للنطاف، والقذف المقبول تم جمعه في عينة واحدة لتفادي الاختلاف الفردي بين الكباش. تم تمديد كل عينة للسائل المنوي بنسبة 10:1 مع وسط التمديد المنوي Tris –Fructose –egg –yolk في حمام مائي على درجة حرارة 37 درجة مئوية. تم تحضير الوسط وفقاً للنسب التالية لكل 100ml: Tris(3.63g)، Fructose (0.50g)، Citric acid (1.99g)، Egg yolk (10ml)، Penicilin (100.000IU). قُسم وسط التمديد إلى اثني عشر عينة بمعدل أربع عينات لكل مكرر، وبواقع ثلاث مكررات. حجم العينة الواحدة 2ml. تم الحصول على هرمون الميلاتونين من شركة

CHINA ،LTD ،HUANGGANG SAIKANG PHARMACEUTICAL CO. أضيف الميلاتونين للعينات للحصول على تركيز نهائي 0.5mM ورمز لها (M1)، 1Mm رمز لها (M2)، 2mM (M3)، وتركت عينة الشاهد(M0) بدون إضافة، تم تجهيز الميلاتونين بإذابته بسائل التمديد، حيث أخذ 1 ميكرومول (0.223 mg) من الميلاتونين وأذيب في 2ml من سائل التمديد للحصول على محلول تركيزه 0.5Mm، وأخذ 2 ml ميكرومول (0.446 mg) منه وأذيب في 2ml من سائل التمديد فحصلنا على محلول تركيزه 1mM، في حين أذيب 3 ميكرومول 0.669 2ml/mg للحصول على تركيز 1.5Mm، وقد تمت إضافة الميلاتونين في حمام مائي على درجة حرارة 37 درجة مئوية مع تحريك مستمر لضمان انحلال مضاد الأكسدة الميلاتونين في وسط التمديد. بعد الانتهاء من التمديد، تم تخفيض درجة الحرارة من 37 درجة مئوية إلى درجة حرارة الغرفة، ومن ثم وضعها في البراد، وحفظها على درجة حرارة 4 مئوية، وفحصت مؤشرات الحركة والسرعة باستخدام جهاز CASA بعد (T1= 24، T2= 48، T3= 72) ساعة من الحفظ.

تحليل المؤشرات الحركية للسائل المنوي بمساعدة الحاسب CASA

استخدم نظام تحليل السائل المنوي بمساعدة الحاسب (CASA) لاختبار عينات من السائل المنوي المبرد من كل تركيز ولجميع مراحل البحث بمساعدة هذا النظام المتطور لتقييم السائل المنوي Sperm Class Analyzer– SCA v.5.1 (CASA system)– Barcelona (Spain)– 2011. تم تسخين الماصات الميكروية والأدوات المستخدمة قبل مداولة السائل المنوي باستخدام صفيحة تسخين على درجة حرارة 37 درجة مئوية، يتم وضع العينة المراد تقييمها ضمن حمام مائي 37 درجة مئوية ولمدة 30 ثانية، ثم تؤخذ كمية 2.5 مكروليتر من عينة السائل المنوي، وتوضع في الحفرة الخاصة بها على الشريحة المدفأة بدرجة حرارة 37 مئوية.

المؤشرات المدروسة:

- **حركة وسرعة النطاف: يبين الجدول مؤشرات الحركة والسرعة المدروسة بوساطة جهاز (CASA):**

الجدول (1): المؤشرات المدروسة بواسطة جهاز (CASA).

المؤشرات المدروسة	المصطلح الانكليزي	وحدة القياس
الحركة الكلية	Motile (MOT)	%
الحركة التقدمية	Progressive (PR)	%
الحركة الساكنة	Immotile (IM)	%
الحركة السريعة	Rapid speed (RS)	%
الحركة البطيئة	Slow speed (SS)	%
الحركة السريعة التقدمية	Rapid progressive (RP)	%
السرعة المنحنية VCL	Velocity curved line	ميكرون/الثانية
السرعة الخطية VSL	Velocity straight line	ميكرون/الثانية
معدل سرعة المسار VAP	Velocity Average path	ميكرون/الثانية
خطية المسار LIN	Linearity (VSL/ VCL)	%
مؤشر الاستقامة STR	Straightness index (VSL/VAP)	%
مؤشر التموج WOB	Oscillation index (VAP/VCL)	%
المدى الجانبي لضربات الرأس ALH	Amplitude lateral head	ميكرون
تردد عبور المسار BCF	Beat frequency	HZ

التحليل الإحصائي: تم تحليل النتائج إحصائياً باستخدام البرنامج الإحصائي (GENSTAT–12)، وذلك باستخدام اختبار (ANOVA)، وتم حساب الفرق المعنوي باختبار Duncan عند مستوى معنوية 5%.

النتائج والمناقشة:

يتبين من الجدول (2): نتائج تحليل حركية نطاف الكباش بعد الجمع مباشرةً:

الجدول (2): نتائج تحليل مؤشرات حركة وسرعة نطاف الكباش بعد الجمع مباشرةً

ALH ميكرون	(RP) %	(SS) %	(RS) %	(IM) %	(PR) %	(MOT) %
5.76	9.56	0.74	97.81	0.18	97.97	99.81
BCF HZ	**WOB %**	**STR %**	**LIN %**	**VAP (ميكرون/ثانية)**	**VSL (ميكرون/ثانية)**	**VCL (ميكرون/ثانية)**
5.87	49.39	50.95	25.16	65.01	33.13	131.71

1-تأثير الميلاتونين في مؤشرات حركية وسرعة نطاف كباش العواس أثناء الحفظ لمدة 72 ساعة

يتبين من الجدول (3): وجود فروق معنوية ($p<0.001$) بين المعاملات المضاف لها الميلاتونين بتراكيز مختلفة والشاهد في جميع مؤشرات حركية النطاف، حيث يُظهر التحليل الإحصائي لمؤشر الحركة الكلية تفوقاً معنوياً ($p<0.001$) للمعاملات M1 وM2 وM3 على الشاهد M0 فقد بلغ متوسط النسبة المئوية للحركة الكلية للنطاف (98.60، 99.45، 99.53، 96.89%) على التوالي. وأظهرت النتائج تفوق المعاملتين M2 وM3 على المعاملة M1 معنوياً، ولم يسجل فرق معنوي ($p> 0.05$) بين M2 وM3. كما أظهرت الحركة التقدمية نتائج مماثلة للحركة الكلية من حيث تفوق المعاملات M1 وM2 وM3 على معاملة الشاهد M0 (53.03، 66.90، 64.63، 44.85%) على التوالي، وهو ما يشير إلى تأثير هرمون الميلاتونين في السلامة الخلوية والهيكلية والوظيفية للنطاف، وعمله كمضاد أكسدة يحد من الإجهاد التأكسدي ويطيل من فترة حفظ السائل المنوي مع قدرة إخصابيه عالية، هذا يتفق مع دراسة أجراها Ashrafi وآخرون [15] لحفظ السائل المنوي بالتبريد على حرارة 5 درجة مئوية لمدة 48 ساعة حيث أظهرت معاملة السائل المنوي بالميلاتونين بتركيز 1 ميلي مولار تفوق معنوي ($p<0.05$) للحركة التقدمية. في مؤشر الحركة السريعة أظهرت المعاملة M2 (63.48%) تفوقاً معنوياً ($p<0.001$) على الشاهد M0 (38.52%) وعلى المعاملتين M1 وM3 (51.08، 60.11%) على التوالي. وهذا يظهر تفوق المعاملة M2 (1 ميلي مولار) على بقية التراكيز في أهم مؤشرين لنجاح الإخصاب وهما الحركة الكلية والتقدمية وأيضاً تفوقها في مؤشر الحركة السريعة على بقية المعاملات. في دراسة أجراها Carriço وآخرون [16] أظهر أن إضافة الميلاتونين بتركيز 1 ميلي مولار تحسن من المؤشرات الحركية للنطاف، وهو ما يتفق مع نتائج دراستنا التي تُظهر تفوق جميع الإضافات والتراكيز على عينة الشاهد. تفوق هذه المعاملات على الشاهد في مؤشرات الحركة الكلية والتقدمية والسريعة انعكس إيجاباً على الحركة البطيئة للنطاف مما أدى إلى انخفاضها في العينات المضاف لها الميلاتونين عن عينة الشاهد، حيث أظهرت النتائج تفوقاً معنوياً ($p<0.001$) للمعاملات M1 وM2 وM3 على M0 (23.22، 12.87، 10.23، 30.76%) على التوالي، وهذا ما يدل على أن إضافة الميلاتونين كمضاد أكسدة يُخفِض من الحركة البطيئة للنطاف من خلال الحد من الإجهاد التأكسدي، والحفاظ على الطاقة اللازمة للبقاء لفترة أطول.

الجدول (3): تأثير التراكيز المختلفة من الميلاتونين في متوسط النسب المئوية لحركية النطاف

الصفة	الحركة الكلية	الحركة التقدمية	الحركة السريعة	الحركة البطيئة	الحركة السريعة التقدمية
M0	96.89c	44.85c	38.52d	30.76d	9.87c
M1	98.60b	53.03b	51.08c	23.22c	12.51a
M2	99.45a	66.90a	63.48a	12.87b	11.11b
M3	99.53a	64.63a	60.11b	10.23a	12.68a
LSD%	0.14***	2.83***	2.84***	1.95***	0.90***
CV%	1	3.7	4	7.7	5.9

تشير الأحرف المختلفة ضمن العمود الواحد إلى وجود فرق معنوي. *معنوي على مستوى معنوية 0.05، **معنوي على مستوى معنوية 0.01، ***معنوي على مستوى معنوية 0.001، ^{ns}غير معنوي

في مؤشر الحركة السريعة التقدمية تفوقت جميع المعاملات معنوياً (p<0.001) M1 وM2 وM3 على الشاهد M0 (12.51، 11.11، 12.68، 9.87%) على التوالي، فيما أظهرت المعاملتين M1 وM3 أعلى قيمة حركية متفوقة بذلك على المعاملة M2 ومعاملة الشاهد. في دراسة أجراها Bhalothia وآخرون [17] باستخدام ممدد للسائل المنوي يشمل التركيز النهائي 1 ميلي مولار من الميلاتونين وحفظها في 4 درجات مئوية، أشارت نتائج الدراسة إلى أن إضافة مضاد الأكسدة الميلاتونين للسائل المنوي يمكن استخدامه لتعزيز العمر التخزيني للسائل المنوي عند 4 درجات مئوية حتى 72 ساعة. وهذا ما يتفق مع نتائج دراستنا.

يتبين من الجدول (4): وجود فروق معنوية (p<0.001) بين فترات حفظ السائل المنوي بالتبريد لكافة المؤشرات الحركية للنطاف (T1، T2، T3). في مؤشر الحركة الكلية تفوق T1 وT2 معنوياً (p<0.001) على T3 (98.73، 98.64، 98.48%) على التوالي، في حين لم يكن هناك فرق معنوي بين الحفظ عند 24 و48 ساعة للمؤشر المذكور. هذا يدل على أن حركية النطاف تنخفض مع ازدياد فترة الحفظ مما يعطي أهمية خاصة لإضافة مضادات الأكسدة للحفاظ على طاقة النطاف الضرورية للإخصاب والحفظ لفترة أطول بجودة عالية. في دراسة Bhalothia وآخرون [17] تتفق مع الدراسة الحالية حيث أثبتت أفضلية تركيز 1 ميلي مولار على باقي التراكيز وتأثيرها الإيجابي على حركية النطاف، وإمكانية استخدام هرمون الميلاتونين لإطالة فترة حفظ السائل المنوي للكباش عند 4 درجات مئوية حتى 72 ساعة، وأظهرت نتائج الحركة التقدمية نتائج مماثلة للحركة الكلية حيث تفوقت T1 (59.40%) وT2 (56.55%) على T3 (44.34%)، ولم يكن هناك فرق معنوي بين T1 وT2. انخفضت الحركة السريعة للنطاف بعد مرور 72 ساعة من الحفظ (T3) (44.34%)، وأظهرت فرقاً معنوياً (p<0.001) بتفوق T1 (59.01%) وT2 (56.55%) عليها. أظهرت نتائج الحركة السريعة التقدمية انخفاضاً للحركة بعد مرور 72 ساعة من الحفظ (T3)، فيما تفوقت معنوياً (p<0.001) T1 (12.22%) وT2 (12.45%) على T3. ولم يسجل وجود فرق معنوي بين T1 وT2. في مؤشر الحركة البطيئة أدى انخفاض الحركة السريعة إلى ازدياد الحركة البطيئة عند 72 ساعة من الحفظ، وهذا ما يشير إلى ازدياد الإجهاد التأكسدي بطول زمن الحفظ مما ينعكس سلباً على القدرة الإخصابية للنطاف وحيويتها. فقد بلغ متوسط النطاف ذات الحركة البطيئة في الزمن T3 (21.88%) في حين كان في T2 وT1 (15.65، 20.29%) على التوالي.

الجدول (4): تأثير طول مدة حفظ السائل المنوي في متوسط النسب المئوية لحركية النطاف

الصفة	الحركة الكلية	الحركة التقدمية	الحركة السريعة	الحركة البطيئة	الحركة السريعة التقدمية
T1	98.73a	59.40a	59.01a	20.29b	12.22a
T2	98.64a	60.85a	56.55a	15.65a	12.45a
T3	98.48b	51.81b	44.34b	21.88b	9.96b
LSD%	0.12^{***}	2.45^{***}	2.46^{***}	1.69^{***}	0.78^{***}
CV%	1	3.7	4	7.7	5.9

تشير الأحرف المختلفة ضمن العمود الواحد إلى وجود فرق معنوي. *معنوي على مستوى معنوية 0.05، **معنوي على مستوى معنوية 0.01، ***معنوي على مستوى معنوية 0.001، ^{ns}غير معنوي

يتبين من الجدول (5، 6): المؤشرات الحركية الأكثر تحديداً ثلاثة مؤشرات لسرعة حركة النطاف: السرعة المنحنية (VCL)، والسرعة الخطية (VSL)، ومعدل سرعة المسار (VAP)، وثلاثة مؤشرات لنسبة السرعة: الخطية (LIN)،

والاستقامة (STR)، والتموج (WOB)، ومؤشرات تعكس خصائص تموج النطاف: المدى الجانبي لضربات الرأس (ALH)، تردد عبور المسار (BCF).

في مؤشر السرعة المنحنية أظهرت المعاملة M2 (88.38 ميكرون/ثانية) تفوقها المعنوي ($p<0.001$) على بقية المعاملات M1 وM3 (76.05، 84.64 ميكرون/ثانية) على التوالي، وعلى عينة الشاهد M0 (68.58 ميكرون/ثانية). يُعد مؤشر VCL عاملاً أساسياً في تحديد قدرة النطاف على الوصول إلى البويضة وإخصابها، حيث تشير القيم المرتفعة إلى حركة أفضل وفرصة أكبر للإخصاب، ومن خلال تحليل VCL إلى جانب مؤشرات السرعة الأخرى VSL وVAP، يمكن تحديد مشاكل الحركة المحددة التي قد تؤثر في الخصوبة، مثل انخفاض السرعة أو أنماط الحركة الشاذة. في السرعة الخطية VSL تفوقت M1 وM2 على M3 وM0 معنوياً ($p<0.001$)، فقد بلغ متوسط سرعة النطاف للمعاملات المذكورة على التوالي (26.91، 27.28، 25.34، 23.17 ميكرون/ثانية) على التوالي، ولم يسجل فرق معنوي ($p> 0.05$) بين M1 وM2، وتفوقت M3 على M0 معنوياً($p<0.001$). مؤشر معدل سرعة المسار VAP أظهر تفوق معنوي ($p<0.001$) للمعاملة M2 (46.40 ميكرون/ثانية)، على بقية المعاملات M1 (43.97 ميكرون/ثانية) وM3 (41.11 ميكرون/ثانية) والشاهد M0 (37.52 ميكرون/ثانية). أظهرت النتائج الإحصائية انخفاض معنوي ($p<0.001$) لسرعة النطاف عند 72 ساعة من الحفظ T3 مقارنة باليوم الأول للحفظ T1، وهذا يؤكد أن الإجهاد التأكسدي يؤثر في معدل النسبة المئوية للنطاف المتحركة والمتحركة التقدمية، وكذلك يؤثر سلباً في سرعة النطاف وقدرتها على الوصول إلى البويضة وإخصابها. أظهرت T3 (71.90 ميكرون/ثانية) لمؤشر VCL انخفاضاً معنوياً عن T1 (83.84 ميكرون/ثانية). انخفضت السرعة الخطية معنوياً ($p<0.001$) في T3 (24.39 ميكرون/ثانية) عن T1 (26.13 ميكرون/ثانية). معدل سرعة المسار انخفض معنوياً ($p<0.001$) في T3 (39.57 ميكرون/ثانية) عن T1 (45.46 ميكرون/ثانية). في دراسة Ashrafi وآخرون [15] تتوافق مع دراستنا في قيم معنوية للسرعة الخطية ومعدل سرعة المسار للتركيز 1 ميلي مولار مقارنة مع الشاهد، إضافة للعديد من الدراسات المذكورة بأثر هرمون الميلاتونين في الحفاظ على طاقة النطاف لفترة أطول، وبالتالي سرعة أعلى وحركة تقدمية أفضل.

LIN (%) هي نسبة VSL/VCL وهي مقياس لاتجاه المسار، STR (%) هي نسبة VSL/VAP وهي مقياس لمدى اندماج المسار، WOB (%) هي نسبة VAP/VCL. الحركة (%)، النسبة المئوية لإجمالي النطاف المتحركة، والحركة التقدمية (%)، المقابلة لحركة النطاف للأمام بسرعة في خط مستقيم (STR ≥45%، VAP≥25 µm/s). في مؤشر LIN تفوق معنوياً الشاهد (34.04%) والمعاملة M1 (34.41%) معنوياً ($p<0.001$) على المعاملتين M2 (31.12%) وM3 (29.19%)، فيما لم تنخفض تلك النسبة بطول مدة الحفظ بل ازدادت في T3 (33.45%) وتفوقت معنوياً على T1 (31.75%) وT2 (31.75%). مؤشر STR تفوقت المعاملة M3 (62.46%) على بقية المعاملات M2 (57.56%) وM1 (60.26%) والشاهد M0 (60.99%)، فيما لم تنخفض تلك النسبة بطول مدة الحفظ، أظهرت النتائج تفوق معنوي ($p<0.001$) لقيمة STR عند T2 (62.68%) عن T1 (57.70%) وT3 (60.57%). تفوقت المعاملة M1 (57.08%) على بقية المعاملات M2 (54.10%) وM3 (52.31%) والشاهد (55.25%) في مؤشر WOB، فيما تفوقت تلك النسبة معنوياً ($p<0.001$) عند T1 (56.97%) على T2 (52.36%) وT3 (54.72%). ALH (ميكرون) هي أقصى قيمة للتموج الجيبي لرأس النطفة حول المسار. BCF (هرتز) هو التردد الذي يعبر به رأس الحيوان المنوي خط المسار المتوسط أثناء العبور.ALH وBCF قياسات مشتقة

من VAP، حيث ALH هي سعة تغيرات المسار لرأس النطفة وعلاقتها مع VAP، BCF: هو متوسط معدل عبور مسار النطفة للمؤشر VAP، وهو مشتق من التردد الحقيقي لنبضات السوط وتردد دوران رأس النطفة. المدى الجانبي لضربات الرأس ALH أظهرت النتائج تفوق المعاملة M2 معنوياً ($p<0.001$) (3.819 ميكرون) على بقية المعاملات M1 و M3 والشاهد (3.377، 3.702، 3.143 ميكرون) على التوالي، فيما لم تنخفض تلك القيمة بطول مدة الحفظ، فقد أظهرت النتائج تفوق معنوي ($p<0.001$) لتلك القيمة عند T2 (3.678 ميكرون) على T1 (3.549 ميكرون) و T3 (3.304 ميكرون). BCF تفوق الشاهد معنوياً ($p<0.001$) (9.558 هرتز) على المعاملات M1 و M2 و M3 (8.629، 8.651، 7.694 هرتز). وكانت القيمة الأعلى عند T1 (8.813 هرتز) متفوقة معنوياً ($p<0.01$) على T3 (8.493 هرتز). تختلف الدراسة الحالية مع دراسة Ashrafi وآخرون [15] بوجود فروق معنوية ($p<0.001$) لجميع المعاملات مع الشاهد في مؤشري STR و ALH.

الجدول (5): تأثير التراكيز المختلفة من الميلاتونين في متوسط سرعة نطاف الكباش

BCF	ALH	WOB	STR	LIN	VAP	VSL	VCL	الصفة
9.558a	3.143d	55.25b	60.99b	34.04a	37.52d	23.17c	68.58d	M0
8.629b	3.377c	57.08a	60.26c	34.41a	43.97b	26.91a	76.05c	M1
8.651b	3.819a	54.10b	57.56d	31.12b	46.40a	27.28a	88.38a	M2
7.694c	3.702b	52.31c	62.46a	29.19c	41.11c	25.34b	84.64b	M3
0.27***	0.16***	1.29***	0.70***	1.18***	1.52***	0.70***	2.30***	LSD%
2.4	3.4	1.8	1	2.8	2.7	2.1	2.2	CV%

تشير الأحرف المختلفة ضمن العمود الواحد إلى وجود فرق معنوي. *معنوي على مستوى معنوية 0.05، **معنوي على مستوى معنوية 0.01، ***معنوي على مستوى معنوية 0.001، ^{ns}غير معنوي

الجدول (6): تأثير طول مدة حفظ السائل المنوي في متوسط سرعة النطاف

BCF	ALH	WOB	STR	LIN	VAP	VSL	VCL	الصفة
8.813a	3.549b	56.97a	57.70c	31.75b	45.64a	26.13a	83.84a	T1
8.594ab	3.678a	52.36c	62.68a	31.37b	41.53b	26.51a	82.50a	T2
8.493b	3.304c	54.72b	60.57b	33.45a	39.57c	24.39b	71.90b	T3
0.23**	0.14***	1.12***	0.61***	1.03***	1.32***	0.60***	1.98***	LSD%
2.4	3.4	1.8	1	2.8	2.7	2.1	2.2	CV%

تشير الأحرف المختلفة ضمن العمود الواحد إلى وجود فرق معنوي. *معنوي على مستوى معنوية 0.05، **معنوي على مستوى معنوية 0.01، ***معنوي على مستوى معنوية 0.001، ^{ns}غير معنوي

الاستنتاجات والتوصيات:

- إضافة الميلاتونين كمضاد أكسدة إلى وسط تمديد السائل المنوي للكباش أسهم في الحفاظ على جودة النطاف أثناء الحفظ بالتبريد على درجة حرارة +4، وتفوقت معاملاتا الميلاتونين بتركيز 1.5، 1 ميلي مولار في أغلب مؤشرات حركية النطاف المدروسة، ونظراً لتفوق التركيز 1 ميلي مولار على جميع المعاملات في أغلب المؤشرات نوصي بإضافته، وأثر إضافته أثناء الحفظ بالتجميد، ودراسة إضافته في مؤشرات أخرى كسلامة الأكروسوم، والشذوذ، والحيوية.

References:

[1] K, Coyan. M.N, Bucak. N, Baspinar. M, Taspinar. S, Aydos. *Ergothioneine attenuates the DNA damage of post-thaw Merino ram sperm.* Small Ruminant Research, 106, pp.165–167, (2012).

[2] S.C, Sikka. *Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function.* Frontiers Bioscience U. S. A. Vol. 1, pp. 78-86, (1996).

[3] M, Kantola. M, Saaranen. T, Vanha-Perttula. *Selenium and glutathione peroxidase in seminal plasma of men and bulls.* J. Reprod. Fertil, Britain, Vol. 83, N°. 2, pp. 785-794, (1988).

[4] J.E, Aurich. U, Schqnherr. H, Hoppe. C, Aurich. *Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen.* Theriogenology, Vol.48, N°.2, pp. 185-192, (1997).

[5] S, Cerolini. A, Maldjian. P, Surai. R, Noble. *Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage.* Animal Reproduction science, Vol. 58, N°.1-2, pp. 99-111, (2000).

[6] P.K, Jha. A.K, Paul. M.B, Rahman. M, Tanjim. F.Y, Bari. M.G, Alam. *Improvement of preservation quality of chilled bull semen using α-tocopherol as an antioxidant.* J. Embryo Trans, Vol. 28, N°.1, pp. 31-39, (2013).

[7] A, Santiani. S, Evangelista. N, Sepulveda. J, Risopatron. J, Villegas. R, Sanchez. *Addition of superoxide dismutase mimics during cooling process prevents oxidative stress and improves semen quality parameters in frozen/thawed ram spermatozoa.* Theriogenology, Vol.82, N°.6, pp. 884–889, (2014).

[8] B, Halliwell. J.M.C, Gutteridge. *Free radicals in biology and medicine.* 3rd ed, Oxford science publications, Oxford, pp. 936. (1999).

[9] W, Droge. *Free radicals in the physiological control of cell function.* American Physiological Society U. S. A. Vol. 82, N°. 1, pp. 47–95. (2002) .

[10] L, O'hara. J.P, Hanrahan. L, Richardson. A, Donovan. S, Fair. A.C, Evans. P, Lonergan. *Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm.* Theriogenology, Vol. 73, N°.4, pp. 541-549, (2010).

[11] M, Shafiei. M, Forouzanfar. S.M, Hosseini. M.H.N, Esfahani. *The effect of superoxide dismutase mimetic and catalase on the quality of post thawed goat semen.* Theriogenology, Vol.83, N°. 8, pp. 1321–1327, (2015).

[12] L.C, Manchester. A, Coto-Montes. J.A, Boga. L.P.H, Andarsen. Z, Zhou. A, Galano. J, Vriend. D.X, Tan. R.J, Reiter. *Melatonin: An ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable.* J Pineal Res. Vol. 59, N°.4, pp. 403-419, (2015).

[13] Y, Fang. C, Zhao. H, Xiang. X, Zhao. R, Zhong. *Melatonin inhibits formation of mitochondrial permeability transition pores and improves oxidative phosphorylation of frozen-thawed ram sperm.* Frontiers in Endocrinology, spain, Vol.10, pp. 516-520, (2020).

[14] A.R, Chaithrashree. S.D, Ingole. V.D, Dighe. A.S, Nagvekar. S.V, Bharucha. N.R, Dagli. P.M, Kekan. S.D, Kharde. *Effect of melatonin on bovine sperm characteristics and ultrastructure changes following cryopreservation.* Vet Med sci, Vol. 6(2), pp. 177-186, (2020).

[15] I, ashrafi. H, Kohram. H, Naijian. M, Bahreini. M, Poorhamdoliah. *Protective effect of melatonin on sperm motility parameters on liquid storage of ram semen at 5°C.* African Journal of Biotechnology, Vol. 10(34), pp. 6670-6674, (2011).

[16] C, Carrico. J.P, Barbas. J, Pimenta. J, Simoes. *Effect of In Vitro Addition of Melatonin and Glutathione on Seminal Parameters of Rams in Diluted Semen and after Thawing.* Vet. Sci, Vol.10, pp. 446, (2023).

[17] S. K, Bhalothia. J. S, Mehta. T, Kumar. C, Prakash. T. R, Talluri. R.S, Pal. A, Kumar. *Melatonin and Canthaxanthin enhances sperm viability and protect ram spermatozoa fromoxidative stress during liquid storage at 4°C*. Andrology, Vol.54(1), DOI: 10.1111/and. 14304, (2022).