جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

تأثير مدد إسالة مختلفة في بعض صفات السائل المنوي المجمد لمدة عامين لثيران الهولشتاين المعاملة وغير المعاملة بهرمون الميلاتونين

رسالة مقدمة إلى مجلس كلية الزراعة في جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في العلوم الزراعية / الإنتاج الحيواني

من قبل

نور محمد محمود

بإشراف

أ. د. رائد ابراهيم خليل

كلية الزراعة – جامعة ديالى

أ. د. ساجدة مهدي عيدان

كلية الزراعة – جامعة بغداد

1440هـ

2018 م

المستخلص

أجريت هذه الدراسة بهدف بيان تأثير غرز هرمون الميلاتونين لصفات السائل المنوي المخزون لمدة طويلة بالنتروجين لثيران الهولشتاين. ونفذت هذه الدراسة في قسم التلقيح الاصطناعي التابع لدائرة الثروة الحيوانية / وزارة الزراعة في منطقة أبي غريب (25 كم غرب بغداد) للمدة من 8/2017/ 15ولغاية 29/4/2018 في هذه التجربة تم استخدام 12 ثوراً من سلالة الهولشتاين، تتراوح أعمارها ما بين 3 -5 سنوات وبوزن جسم يتراوح بين 500 - 750 كغم، تم جمع السائل المنوي وخزن لمدة عامين من تجربه سابقة لأحد طلبه الدراسات العليا (تجربة تكميلية). وزعت الثيران عشوائياً في تجربة سابقة اجريت في مركز التلقيح الاصطناعي الى ثلاث مجاميع (4 ثيران/ معاملة)، وقد تركت ثيران المجموعة الأولى بدون إي معاملة وعدت كمجموعة سيطرة (G1). اما ثيران المجموعتين الثانية والثالثة (G2؛G3) فقد غرزت بهرمون الميلاتونين تحت جلد قاعدة الاذن اليسرى بمقدار (54 و72ملغم/ثور) على التوالي، وأعيد غرز هرمون الميلاتونين للثيران بعد شهر من الغرزة الأولى. تم جمع عينات السائل المنوي من الثيران بعد مرور 5 و10 أسابيع من بدء المعاملة وبواقع جمعتين/ ثور بالأسبوع الواحد وثم حفظها بالتجميد العميق في النتروجين السائل في درجة $^{-}$196مْ، لمدة عامين وأكثرثم قسمت قصبات المجاميع الثلاثة الرئيسية الحاوية على السائل المنوي الى ثلاث مجاميع فرعية اعتمادا على فترة الاسالة وهي 30ثانية؛ ساعتين؛ اربع ساعات وبدرجة حرارة 37مْ. بعدها تم تقسيم السائل المنوي ولكل فترة اسالة. كما تم حساب قابلية التجميد وتركيز كل من المالون داي الديهايد (MDA) و مضادات الاكسدة الكلية (TAC) و السوبر اوكسيد ديسموتيز (SOD) والكاتليز(CAT) وضرر المادة الوراثية DNA للنطف لعينات السائل المنوي للاسبوع الخامس والعاشرمن المعاملة وبعد الحفظ بالتجميد لمدة عامين. واوضحت النتائج وجود تفوق معنوي ($P\leq0.05$ او$P\leq0.01$) للمعاملتين G2 وG3 على المعاملة G1 للنسبة المئوية للحركة الفردية للنطف وللعدد الكلي للنطف المتحركة (10^6) والنسبة المئوية للنطف الحية ولسلامة الغشاء البلازمي ولسلامة الأكروسوم وللعدد الكلي للنطف سليمة الغشاء البلازمي (10^6) وللعدد الكلي للنطف سليمة الأكروسوم ولعدد أجزاء النطف الحيوية (10^6) عند فترة الاساله 2 و4 ساعات للأسبوع الخامس والعاشر. كما أظهرت النتائج وجود انخفاض معنوي ($P\leq0.01$) للنسبة المئوية للتشوهات الكلية للنطف. ولم يكن هنالك اي تأثير معنوي بين معاملات التجربة المختلفة لكل من تركيزي الملون ثنائي الالديهايد(MDA؛Malondialdehyde) وسوبر اوكسيد دسميوتيز (SOD; superoxide dismutase) وضرر المادة الوراثية للنطف. في حين ازدادت كمية مضادات الأكسدة الكلية (TAC؛ Total antioxidants)معنوياً ($P\leq0.01$) لدى المعاملتين G2 وG3 مقارنة مع المعامله (G1) بعد الأسبوع الخامس من المعاملة وبعد الحفظ بالتجميد لمدة عامين.وأستمر تفوق المعاملة G3 على G1 حتى عند الأسبوع العاشر من المعاملة ولنفس الصفه المذكورة. أزداد تركيز الكتاليز(CAT؛Catalase) معنوياً ($P\leq0.05$) لدى المعاملة G3 مقارنة مع المعاملتين G1 وG2عند الأسبوع الخامس من المعاملة وبعد الحفظ بالتجميد لمدة عامين كاملين.نستنتج من هذة الدراسة أمكانية استخدام هرمون الميلاتونين كمضاد أكسده لتحسين او المحافظة على صفات السائل المنوي المجمد لفترة طويلة. وهذا بالتأكيد سيكون له أثر في المحافظة على صيانة المصادر الوراثية لاسيما لدى الثيران المتميزة وراثياً كما سيساعد على زيادة نسب الأخصاب والحمل لدى الأبقار.

قائمة المحتويات

التسلسل	الموضـــــــــــوع	الصفحة
الفصل الأول	المقدمة (Introduction)	1-2
الفصل الثاني	مراجعة المصادر(Review of literature)	3-27
1-2	أيض النطف (Sperm metabolism)	3
2-2	أضرار الحفظ بالتجميد للسائل المنوي (Damage to freezing of semen)	5
3-2	تأثير فترات الحفظ الطويلة على نوعية السائل المنوي للثيران (Effect of long period cryopreservation on semen quality)	7
4-2	تأثير أوقات أسالة مختلفة على نوعية السائل المنوي (Effect of different thawing times on semen quality)	8
5-2	الجهد التاكسدي (The oxidative stress)	10
6-2	الجذور الحرة (Free radicals)	12
7-2	انواع الجذور الحرة (Free radicals types)	13
8 -2	أضرار الجذور الحرة على السائل المنوي (Damage free radicals on semen)	14
9-2	مضادات الاكسدة (Antioxidants)	15
10-2	الميلاتونين (Melatonin)	18
11-2	أيض الميلاتونين (Metabolism of melatonin)	21
12-2	الميلاتونين كمضاد أكسدة (Melatonin as an Antioxidant)	22
13-2	تأثير المعاملة بهرمون الميلاتونين على صفات السائل المنوي (Treatment effect of the hormone melatonin on the characteristics of semen)	22
14-2	ضرر المادة الوراثية (DNA Damage)	24
الفصل الثالث	المواد وطرائق العمل (Materials and methods)	28-45
1-3	حيوانات التجربة (Experimental animal)	28
2-3	تصميم التجربة (Experimental design)	29
3-3	جمع السائل المنوي (Semen collection)	32
4-3	الفحوصات المجهرية (Microscopic exminations)	32
1-4-3	الحركة الفردية (Motility of Sperms)	32
2-4-3	النسبة المئوية للنطف الحية (Life sperm percentage)	32
3-4-3	النسبة المئوية للنطف المشوهة (Abnormal sperm percentage)	33
4-4-3	سلامة الغشاء البلازمي (Plasma membrane integrity)	34
5-4-3	سلامة الأكروسوم (Acrosome integrity)	34
6-4-3	تقدير العدد الكلي لصفات النطف المختلفة في القصبة الواحدة (Determination of Total number per straw for different sperm characteristics)	36

التسلسل	الموضـــــــــوع	الصفحة
7-4-3	تقدير قابلية التجميد (Freezing ability)	36
5-3	قياس تركيز مركب Malondialdehyde في البلازما المنوية (Malondialdehyde in semen plasma)	37
6-3	حساب النشاط الكلي لمضادات الأكسدة في البلازما المنوية (Total antioxidant activity in semen plasm)	37
7-3	قياس تركيز سوبر اوكسيد ديسموتيز(Superoxide dismutase SOD)	40
8-3	قياس تركيز الكاتليز Catalase (CAT)	41
9 -3	تقدير النسبة المئوية لضرر المادة الوراثية (Assessment of sperm DNA fragmentation percentage)	41
1-9-3	تحضير صبغة الاكريدين البرتقالية (Preparation of acridine orange stain)	42
2-9-3	تحضير محلول تايرويد(Preparation of Tyrode's solution)	42
3-9-3	تحضير محلول التثبيت(Preparation of fixative solution)	42
4-9-3	طريقة التصبيغ (Staining method)	43
5-9-3	تقييم ضرر المادة الوراثية (Assessment of DNA fragmentation)	43
10-3	التحليل الإحصائي(Statistical analysis)	45
الفصل الرابع	النتائج والمناقشة (Results and discussion)	46-91
1-4	النسبة المئوية لحركة النطف الفردية (Sperm's cell individual motility)	46
2-4	العدد الكلي للنطف المتحركة (Total motile spermatozoa, TMS)	50
3-4	النسبة المئوية للنطف الحية (Live sperms percentage)	53
4-4	العدد الكلي للنطف الطبيعية (Total normal morphology , TMP)	56
5-4	النسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي للنطف (Sperm's plasma memberane integrity)	58
6-4	العدد الكلي للنطف سليمة الغشاء البلازمي (Total plasma membrane integrity)	61
7-4	النسبة المئوية لسلامة اكروسوم النطف (Sperm's acrosome integrity)	64
8-4	العدد الكلي للنطف ذات الاكروسوم السليم (Total Acrosome integrity, TSA)	67
9-4	عدد النطف المتعرضة لصدمة الضغط الاوزموزي (Toatal of sperm osmotic shock,TOS)	69
10-4	العدد الكلي لاجزاء النطف الحيوية (Total function sperm fraction , TFSF)	72
11-4	النسبة المئوية لتشوهات النطف الكلية (Percentage of total sperm abnormalities)	75

التسلسل	الموضـــــــــــوع	الصفحة
12-4	النسبة المئوية لتشوهات رأس النطف (Sperm’s head abnormalities percentage)	78
13-4	النسبة المئوية لتشوهات القطعة الوسطية لذيل النطف (Percentage of sperm's tail midpiece abnormalities)	80
14-4	النسبة المئوية لتشوهات القطعة الوسطية والذيل للنطف (Percentageofspermtail'sprincipalandterminal abnormalities)	82
15-4	نسبة قابلية التجميد (Freezing ability percentage)	84
16-4	تركيز المالون داي الديهايد(MDA) في البلازما المنوية (Malondialdehyde concentrations in seminal plasma)	85
17-4	فعالية مضادات الاكسدة الكلية في البلازما المنوية (Seminal plasma total antioxidants activity)	87
18-4	قياس تركيز سوبر اوكسيد ديسموتيزفي البلازما المنوية(SOD) (Superoxide dismutase concentrations in seminal plasma)	89
19-4	قياس تركيز انزيم الكاتليز في البلازما المنوية(CAT) (Catalase concentrations in seminal plasma)	90
20-4	النسبة المئوية للنطف المتضررة للمادة الوراثية (Sperm's DNA fragmentation percentage)	91
الفصل الخامس	**الاستنتاجات والتوصيات (Conclusions and recommendations)**	**92-93**
الفصل السادس	**المصادر (Refrences)**	**94-118**
1-6	المصادر العربية	94
2-6	المصادر الأجنبية	95

قائمة الجـــداول

التسلسل	الموضـــــــــــوع	الصفحة
1	تاثيرغرز هرمون الميلاتونين وفترات الأسالة في النسبة المئوية لحركة النطف الفردية لدى ثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدة عامين	49
2	تاثيرغرز هرمون الميلاتونين وفترات الأسالة في العدد الكلي للنطف المتحركة(TMS ؛$\times 10^6$*15/10^6نطفة) لدى ثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدة عامين	52
3	تاثيرغرز هرمون الميلاتونين وفترات الأسالة في النطف الحية لدى ثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدة عامين	55
4	تاثيرغرز هرمون الميلاتونين وفترات الأسالة في العدد الكلي للنطف الطبيعية (TMP ؛$\times 10^6$*15/10^6نطفة) لدى ثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدة عامين	57
5	تاثيرغرز هرمون الميلاتونين وفترات الأسالة في سلامة الغشاء البلازمي للنطف لدى ثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدة عامين	60
6	تاثيرغرز هرمون الميلاتونين وفترات الأسالة في العدد الكلي للنطف سليمة الغشاء البلازمي (THOS ؛ $\times 10^6$*15/10^6نطفة) لدى ثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدة عامين	63
7	تاثيرغرز هرمون الميلاتونين وفترات الأسالة في سلامة الاكروسوم للنطف لدى ثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدة عامين	66
8	تاثيرغرز هرمون الميلاتونين وفترات الأسالة في العدد الكلي للنطف ذات الاكروسوم السليم (TSA ؛$\times 10^6$*15/10^6نطفة) لدى ثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدة عامين	68
9	تاثيرغرز هرمون الميلاتونين وفترات الأسالة في عدد النطف المتعرضة لصدمة الضغط الاوزموزي في العدد الكلي للنطف (TOS ؛$\times 10^6$*15/10^6نطفة)لدى ثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدة عامين	71
10	تاثيرغرز هرمون الميلاتونين وفترات الأسالة في العدد الكلي لاجزاء النطف الحيوية (TFSF ؛$\times 10^6$*15/10^6نطفة)) لدى ثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدة عامين	74
11	تاثيرغرز هرمون الميلاتونين وفترات الأسالة في التشوهات الكلية للنطف لدى ثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدة عامين	77
12	تاثيرغرز هرمون الميلاتونين وفترات الأسالة في تشوهات رأس النطف لدى ثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدة عامين	79
13	تاثيرغرز هرمون الميلاتونين وفترات الأسالة في تشوهات القطعة الوسطية لذيل النطف لدى ثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدة عامين	81
14	تاثيرغرز هرمون الميلاتونين وفترات الأسالة في تشوهات القطعة الوسطية والذيل للنطف لدى ثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدة عامين	83

قائمة الأشكـــال

التسلسل	الموضـــــــــوع	الصفحة
1	المصادر التي تعمل على زيادة أنواع الأوكسجين التفاعلي (ROS)	11
2	العوامل التي تؤدي الى الإجهاد التأكسدي للنطف	12
3	المركبات المتكونة التي بإمكانها ان تتحطم وتتحلل وتطلق مركبات طياره ذات سلسله قصيرة مثل الالديهايدات والكيتونات مثل(Malondialdehyde (MDA	15
4	مسارات الجذور الحرة ودور مضادات الاكسدة	17
5	مواقع تواجد مضادات الاكسدة في الخلية	18
6	الصيغه الجزيئية للميلاتونين	18
7	خطوات تصنيع هرمون الميلاتونين في الغدة الصنوبرية	19
8	تخطيط التجربة	31
9	تاثيرغرز هرمون الميلاتونين في قابلية التجميد للنطف لدى ثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدة عامين	84
10	تاثيرغرز هرمون الميلاتونين في تركيز المالون داي الديهايد(MDA) لدى ثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدة عامين	86
11	تاثيرغرز هرمون الميلاتونين في تركيز مضادات الاكسدة الكلية(TAC) لدى ثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدة عامين	88
12	تاثيرغرز هرمون الميلاتونين في تركيز سوبر اوكسيد ديسموتيزفي البلازما المنوية(SOD) لدى ثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدة عامين	89
13	تاثيرغرز هرمون الميلاتونين في تركيز انزيم الكاتليز في البلازما المنوية (CAT) لدى ثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدة عامين	90
14	تاثيرغرز هرمون الميلاتونين في النسبة المئوية للنطف المتضررة للمادة الواثية DNA لدى ثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدة عامين	91

قائمة الصور

التسلسل	الموضـــــــــوع	الصفحة
1	النطف الحية (A) والميتة (B) لدى ثيران الهولشتاين	33
2	يشير حرف A الى الغشاء البلازمي الطبيعي و حرف B الى الغشاء البلازمي الغير طبيعي	34
3	يشير A الى سلامة الاكروسوم ويشير B الى الاكروسوم المتضرر	35
4	إذ تشير الى ضرر المادة الوراثية للنطف باستخدام مجهر آلفلورسنت .اللون الأخضريشير الى سلامة المادة للوراثية (a) في حين يشير اللونين الأحمر والأصفر الى ضرر المادة الوراثية (b) . قوة تكبير X40	44

الفصل الاول

المقدمة

Introduction

تعد عملية تجميد السائل المنوي التقانة الاوسع انتشاراً في العالم لنشر الصفات الوراثية المميزة لدى حيوانات المزرعة على نطاق واسع (Oliveira واخرون، 2013). وقد تم حفظ السائل المنوي بالتجميد (Semen cryopreservation) منذ اكثر من نصف قرن لأغراض التلقيح الاصطناعي (Calisici، 2010). وتعدعملية حفظ السائل المنوي بالتجميد من أكفأ الطرائق في الوقت الحاضر لكونها تحافظ على سلامة النطف وإطالة مدة خزنها وبالتالي زيادة معدل الأخصاب والحمل عند استخدامها لأغراض التلقيح الاصطناعي (Lemma،2011؛Crespilho واخرون،2014). وتؤدي عملية حفظ السائل المنوي بالتجميد في اغلب الاحيان الى إحداث ضرر في خلايا النطف لدى معظم اللبائن ومنها الثيران (Amirat-Briand واخرون،2009). خلال أنتاجها لأنواع الاوكسجين التفاعلي (Reaction oxygen species, ROS) الذي له أثر كبير في أكسدة الدهون (Lipid peroxidation, LPO) لأغشية النطف، فضلاً عن تحطم المادة الوراثية (DNA damage)، وبالتالي انخفاض حركة النطف (Sperm motility) وحيويتها (Viability) وقابليتها على الاخصاب (Fertilizing ability) في الثيران (Chatterjee وGagnon،2001؛Sariöskan واخرون،2009؛Crespilho واخرون ،2014).

أن الإجهاد التأكسدي الناتج من عمليات التجميد والأسالة للسائل المنوي (Freezing-thawing processes) غالباً ما يرافقه انخفاض تركيز مضادات الاكسدة في البلازما المنوية (Seminal plasma) وبالتالي يسبب في انخفاض مستويات جزيئات الدفاع الانزيمية وغيرالانزيمية والدفاعات الانزيمية مثل الكاتليز (CAT; Catalase) وسوبر اوكسيد دسميوتيز (SOD; superoxide dismutase) وكلوتاثيون بيروكسديز (GPx; Glutathione peroxidase) وغيرالانزيمية مثل فيتامين C و E في البلازما المنوية (Aitken وBaker،2004؛Sikka،2004؛Taşdemir واخرون،2013). مما يؤدي إلى أحداث تغيرات في الغشاء البلازمي وتغير في فعالية البروتينات ومن ثم تغاير نفاذية الماء والمواد المذابة وفقدان حيوية النطف (Purdy واخرون،2010).

يتم تصنيع هرمون الميلاتونين من الغدة الصنوبرية (pineal gland) أثناء الليل كرد فعل على التغيرات في مستويات الضوء(Panke واخرون،1979؛Reiter واخرون، 2000؛Siu واخرون ،2006). وللهرمون مستقبلات في جميع خلايا وأعضاء الجسم في الكائنات الحية منها الخصية والمبيض(Reiter واخرون،2010؛Cebrian-Perezواخرون،2014). من ناحية أخرى فأن لهرمون الميلاتونين العديد من الأحداث الفسيولوجية المهمة مثل تنظيم الإيقاع اليومي (circadian rhythms) والتناسل الموسمي (seasonal reproduction) وتعزيز المناعة للجسم (Reiter، 1973؛Haldar،2012). كما يعمل كمضاد للأكسدة من خلال تنشيط مضادات الأكسدة الأنزيمية مثل الكاتليز (CAT) وسوبر اوكسيد دسميوتيز (SOD) وكلوتاثيون البيروكسديز (GPx) وبالتالي

إزالة الجذور الحرة (Okataniواخرون،2000؛Rodriguezواخرون،2004) يمتلك الميلاتونين التاثير الوقائي كمضاد قوي للأكسدة من خلال فعاليته العالية في تثبيط أكسدة الدهون من خلال أزالة جذرالهيدروكسيل hydroxyl radical scavenger ;$OH^{\bullet}$ (Leeواخرون،2002؛ El -Sokkary واخرون،2003). علاوة على كونه، يمتلك القدرة على إزالة الجذور الحرة مثل الأكسجين التفاعلي (ROS) وأنواع النيتروجين، وهنالك دراسات اثبتت أن الميلاتونين من مضادات الاكسدة الأكثر كفائه كونه محب للدهون والماء والذي يمكن العبور بسهولة عبر الاغشية (Reiterواخرون، 2004)، مثل حاجز الخصية الدموي (Blood testis barrier) وبالتالي يعمل على حماية معظم خلايا النطف داخل النبيبات المنوية (Lena واخرون،2003)، من خلال تحفيز نشاط الأنزيمات المضادة للأكسدة (El-Sokkary وآخرون،2003).

وبما ان الميلاتونين يُعدْ من مضادات الأكسدة القوية وله أثر فعال في الحفاظ على نوعية النطف من الضرر التأكسدي ومن الموت المبرمج لخلايا النطف وهذا ينعكس إيجابيا في اطالة مدة حفظ السائل المنوي المخزون بالنتروجين وتحسين صفاته ونوعيته وبالتالي زيادة نسب الاخصاب والحمل. وان عمره النصفي Half-Life في الدم يتراوح أقل من 30إلى 60 دقيقة (Barrenetxe واخرون،2004 ؛Pandi-Perumal وآخرون، 2006). لذا نحن نعتقد أن غرز هرمون الميلاتونين سوف يعمل على أطلاق هرمون الميلاتونين للجسم بشكل مستمر طوال النهار والليل وبالتالي سوف يعمل على حماية النطف وزيادة كمية مضادات الأكسدة في السائل المنوي لذا فقد صممت هذه الدراسة بهدف بيان تأثير غرز هرمون الميلاتونين في صفات السائل المنوي المخزون لمدة طويلة بالنتروجين السائل لثيران الهولشتاين لتحقيق الاهداف الاتية:

1- تحديد تأثير هرمون الميلاتونين في صفات السائل المنوي لثيران الهولشتاين المحفوظ بالتجميد لمدة عامين بالنتروجين السائل.

2- تحديد تأثير مقاومة النطف لفعل التجميد طويل الأمد وعلاقة ذلك بفترات إسالة مختلفة (30ثانية؛ ساعتين؛ اربع ساعات).

3- تأثير غرز هرمون الميلاتونين في تركيز المالون داي الديهايد وتركيز مضادات الاكسدة الكلية وكل من انزيم SOD وCAT وضرر DNA في البلازما المنوية بعد حفظة لمدة عامين لدى ثيران الهولشتاين.