تأثير أضافة اللاكتوفيرين في مخففات السائل المنوي للكباش العواسية في بعض الصفات الفيزياوية للنطف

زينب عادل مهدي * عبد الكريم عبد الرضا هوبي
باحث أستاذ
قسم الانتاج الحيواني – كلية الزراعة – جامعة بغداد
zinabalmoosawe@yahoo.com

المستخلص

لمعرفة تأثير اضافة بروتين اللاكتوفيرين على بعض الصفات الفيزياوية للنطف.أجريت هذه الدراسة في حقل الاغنام والماعز التابع لقسم الانتاج الحيواني/ كلية الزراعة / جامعة بغداد مجمع الجادرية وذلك للفترة من 21 ايلول 2015 ولغاية 24 كانون الثاني 2016. استخدمت في التجربة (4) كباش عواسية بعمر2-4 سنوات ، وبمتوسط وزن 52 كغم وتم اجراء عملية جمع للسائل المنوي من الكباش الاربعة وتمت عمليات جمع السائل المنوي مرتين اسبوعيا باستخدام المهبل الاصطناعي . قسمت معاملات التجربة الى اربع معاملات المعاملة (القياس) التي اضيف لها المضادات الحيوية (100,000 وحدة دولية بنسلين/ 100 مل$^{-1}$) و (100 ملغم ستربتومايسين / 100 مل$^{-1}$) الى مخفف السائل المنوي للمعاملة الثانية (400 ملغم بروتين اللاكتوفيرين /لتر$^{-1}$) ، الثالثة (800 ملغم بروتين اللاكتوفيرين / لتر$^{-1}$) و الرابعة (1200 ملغم بروتين اللاكتوفيرين /لتر$^{-1}$) الى مخففات السائل المنوي . وحفظت عينات السائل المنوي بعد التخفيف لمدة 5 ايام وعلى درجة حرارة 5 مْ أجريت الفحوص الفيزيائية للسائل المنوي و شملت الحركة الفردية والنطف الميتة والمشوهة و اختبار سلامة الغشاء البلازمي HOST في المعاملات الاربع. بينت نتائج الدراسة حصول تفوق معنوي في الحركة الفردية للنطف في المعاملات التي اضيف اليها بروتين اللاكتوفيرين في اليوم الثاني والثالث والرابع وحتى الخامس من فترة الحفظ بالتبريد . أتضح عدم وجود فروقات معنوية في نسبة النطف الحية باضافة بروتين اللاكتوفيرين كمضاد حيوي في مخففات السائل المنوي. لم يؤثر احلال بروتين اللاكتوفيرين كمضاد حيوي في مخففات السائل المنوي بدلا من المضادات الحيوية المعتادة في حدوث تلف في الغشاء البلازمي خلال فترات الحفظ المختلفة في التبريد. كذلك اوضحت النتائج عدم وجود اختلافات معنوية في النسبة المؤية للنطف المشوهه مقارنة بمجموعة القياس وبهذا فان اضافة اللاكتوفيرين كمضاد حيوي لم تؤثر في ارتفاع نسبة النطف المشوهة عند الحفظ بالتبريد للايام المختلفة.

كلمات مفتاحية : اللاكتوفيرين . المضادات الحيوية ، السائل المنوي للكباش.

* البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences – 47(6):1454-1460, 2016 Mahdi & Houbi

EFFECT OF LACTOFERRIN ADDITION TO THE SEMEN OF AWASSI RAMS ON SOME PHYSICAL PROPERTIES OF SPERMS

Z.A. Mahdi * A. A. Houbi
Researcher Prof.
Dep .of Animal Production - Coll. of Agric., Univ .of Baghdad
zinabalmoosawe@yahoo.com

ABSTRACT

This experiment was conducted at the Animal Production Department farm to the College of Agriculture, University of Baghdad, located at Jadreya during the period of 21 September 2015 to 24 February 2016 using Four Awasi rams aged 2-4 years and the average weight was 52 kg. Semen collection from rams was done twice weekly by using the artificial vagina to study the effect of using the lactoferrin protein as a replacement by the antibiotic in the semen for controlling the contamination of bacteria in the semen. Four treated groups were used, the control (normal antibiotic Streptomycin 100 mg\100ml Penicillin100.000 IU / 100ml) , second ,third and fourth treatment groups was used a lactoferrin protein with the contamination of 400, 800 and 1200 mg \ L^{-1} , respectively . All additions of the antibiotic and lactoferrin were done to the semen after dilution. Semen from all rams was pooled and the final volume was divided by four parts to groups .The semen diluent was kept at the refrigerator 5 C for 5 days, and every day the physical characteristic was done which included. The individual motility, dead and abnormal sperm, concentration of sperm, mass activity, integrity of the plasma membrane (HOST %) The results showed that: the individual motility of sperm was significantly increased) for all treated groups on the second, third, fourth and the fifth day of semen preservation. No significant difference in the percentage of live sperm as a result of adding lactoferrin to the semen. There were no significant increase) in the hyper osmotic sperm test (HOST%) between the control and treatment groups. The abnormality of sperm did not differ between the control and the treated groups.

Key Words : Lactoferrin, antibiotics, ram semen

***Part of M.Sc. Thesis of the first author .**

المقدمة

يعد اضافة المضادات الحيوية في مخففات السائل المنوي عاملا مهما للسيطرة على البكتيريا الموجودة نتيجة عمليات التلوث البكتيري وتوقف عددها و حصول المستعمرات الجرثومية (Colony Forming Units (CFU والتي تؤثر بصورة مباشرة على نوعية السائل المنوي المحفوظ والتي قد تكون المسبب في حدوث انتقال للحالات المرضية.ان خلو السائل المنوي من الملوثات والمسببات المرضية او السيطرة عليها تعتبر من الشروط المهمة والواجب توفرها في السائل المنوي الطازج والمخفف المعد للتلقيح الاصطناعي لما لهذه العملية من اهمية في السيطرة على الامراض الانتقالية بين الحيوانات والاحتفاظ بخصوبة جيدة للسائل المنوي (12). وقد اتضح ان مجموع المضادات الحيوية المضافة وبأنواعها المختلفة قادرة على السيطرة على العوامل المسببة للامراض وتحديد نشاطها او عدم احداث أي أثار سلبية لاستعمال هذه المضادات على نوعية الحيوانات المنوية (22). وقد تبين ان اضافة مستويات مختلفة من المضادات الحيوية اسهمت في الحفاظ على سلامة ونشاط الحيوانات المنوية خلال عملية التبريد، وتتاثر التجمعات البكتيرية ومستويات مقاومتها بشكل متفاوت نتيجة للاختلاف بنوع الذكور المستخدمة لجمع السائل المنوي والمخففات المستخدمة(15) و (4) وان اضافة هذه المضادات الحيوية تعمل على السيطرة على النمو البكتيري والسيطرة على ظروف تكاثرها (10). ان بروتين اللاكتوفيرين من البروتنات المهمة التي تنتمي لبروتينات عائلة الترانسفيرين الذي كان اول اكتشاف له عام 1939 م (17). ولهذا البروتين وظائف مهمة في الجانب الدفاعي ضد المسببات المرضية (17)، (4)،(6) و(3). يوجد بروتين اللاكتوفيرين في الانسجة المختلفة في الجسم كالخلايا الظهارية والدموع واللعاب والسوائل المهبلية والسائل المنوي والافرازات الانفية وافرازات الشعب الهوائية والعصارة الصفراء وكذلك سوائل الجهاز الهضمي والبولي وبلازما الدم كما يوجد في السائل المحيط بالجنين في رحم الام واخيرا يوجد ونسب كبيرة في الحليب ولاسيما في اللبأ (9). لذلك جاءت هذه الدراسة لمعرفة تاثير اضافة بروتين اللاكتوفيرين لمخفف السائل المنوي للكباش العواسية غلى بعض الصفات الحيوية للنطف.

المواد وطرائق العمل

جمع وتخفيف وتجميد السائل المنوي: اجريت هذه الدراسة في الحقل الحيواني و مختبر فسلجة تناسل الحيوان التابعين لقسم الانتاج الحيواني / كلية الزراعة جامعة بغداد / مجمع الجادرية . للفترة من 21 أيلول 2015 وحتى 24 كانون الثاني 2016. تم اجراء عملية جمع السائل المنوي من 4 كباش عواسي محلية بواسطة المهبل الاصطناعي وبواقع مرتين في الاسبوع . ثم مزج العينات) (Pooled Semen) وتخفيف و بنسبة10:1 تم تحضير مخفف الترس حسب طريقة Salamon وMaxwell (13)، وبأربعة مستويات من المضاد الحيوي قسمت معاملات التجربة الى اربع معاملات المعاملة (القياس) التي اضيف لها المضادات الحيوية (100,000وحدة دولية بنسلين/ 100 مل) و(100 ملغم ستربتومايسين / 100 مل) الى مخفف السائل المنوي للمعاملة الثانية 400 ملغم بروتين اللاكتوفيرين /لتر)، الثالثة (800 ملغم بروتين اللاكتوفيرين / لتر) و الرابعة (1200 ملغم بروتين اللاكتوفيرين /لتر) الى مخففات السائل المنوي.

صفات السائل المنوي التي تم دراستها : الحركة الفردية: تم تقدير الحركة الفردية وذلك بوضع قطرة من السائل المنوي على شريحة زجاجية مع قطرة صغيرة من سترات الصوديوم بتركيز 2.9% ومن ثم وضع غطاء من شريحة (Cover Slid) تحت المجير الضوئي ويفحص بقوة تكبير x400 وحسبت الحركة الفردية عمى نسبة النطف المتحركة حركة تقدمية أمامية حسب طريقة Walton (20) .

اختبار سلامة الغشاء البلازمي (HOST%): قدرت النسبة المئوية للنطف ذات الغشاء البلازمي السليم بحسب طريقة (Jeyendran واخرون ،1948) (8) وتم عد النطف في حقول مختلفة من الشريحة بعد ذلك حسبت النسبة المئوية للنطف المنتفخة و الملفوفة الذيل.

نسبة النطف المشوهة : تم حساب النطف المشوة على وفق طريقة Hancock (7) وبالشريحة الخاصة نفسها في حساب النطف الميتة، وتم فحصها تحت المجهر بقوة تكبير (400X) وتم تحديد نسبة النطف المشوة من خلال (200) نطفة في حقول مختلفة من الشريحة وحساب النسبة المئوية للنطف المشوهة من مجموع 200 نطفة.

نسبة النطف الميتة: تم حساب نسبة النطف الميتة بأخذ قطرة من السائل المنوي وضعت على شريحة زجاجية نظيفة ومدفئة بدرجة حرارة (37 مْ) وأضيفت قطرة من مزيج صبغة الايوسين (5%) و النكروسين (10 %)، ثم عملت مسحة على شريحة زجاجية أخرى وفحصت تحت المجهر بقوة تكبير (400X) اذ تظهر النطف الميتة باللون الوردي بينما النطف الحية تكون ذات لون شفاف لعدم أختراق الصبغة للغشاء الخلوي ،وقد تم حساب (200) نطفة في حقول مختلفة من الشريحة بعد ذلك قدرت النسبة المئوية للنطف الميتة في القذفة حسب طريقة (18).

التحليل الإحصائي: استعمل البرنامج الإحصائي SAS (14) في تحليل البيانات لدراسة تأثير المعاملة لكل وقت (الانموذج الرياضي الاول) وتأثير الوقت لكل معاملة (الانموذج الرياضي الثاني) وفق تصميم عشوائي كامل (Completely Randomized Design-CRD)، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات الحسابية حسب اختبار Duncan (1955) متعدد المديات.

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج الدراسة الحالية عدم وجود فروق معنوية (P< 0.05). في الحركة الفردية لنطف الكباش عند اليوم الاول من التخفيف (جدول 1) ، اذ بلغت 84.67 ± 2.60 ، 86.17 ± 3.61 ، 88.50 ± 2.21 و 87.33 ± 2.04 %) للمعاملات السيطرة ، T1 ، T2 ، T3 على التوالي ، عند اليوم الثالث اذ بلغت 47.50 ± 6.15 ، 51.67 ± 6.79 ، 56.67 ± 4.01 و 61.17 ± 3.74 % للمعاملات المذكورة انفاً وفي الترتيب نفسه على التوالي. في حين اتضح وجود فرق معنوي (P< 0.05) في النسبة المئوية للحركة الفردية لنطف الكباش عند اليوم الثاني من التخفيف اذ تفوقت المعاملات الثلاث باللاكتوفيرين (T1، T2، T3) والتي بلغت 77.83 ± 3.65 ، 76.33 ± 2.26 و 77.83 ± 1.83 % على التوالي مقارنة بمجموعة السيطرة 66.33 ± 3.67 %، (جدول 1) . بينما أتضح في اليوم الرابع حصول تفوق معنوي (P< 0.05) واضح للمعاملة T3 (53.40 ± 3.24 %) . أما في اليوم الخامس بعد التخفيف فقد تفوقت معنويا (P< 0.01) المعاملة (T1) في الحركة الفردية للنطف (28.33 ± 6.01 %) مقارنة بمجموعة السيطرة (10.00 ± 0.00) في حين لم تختلف المعاملة الثانية والثالثة معنويا (P< 0.05) عن مجموعة السيطرة (جدول 1). أما بخصوص تاثير الوقت بعد التخفيف، فأنه بشكل عام اتضح ان هنالك انخفاضا تدريجيا في النسبة المئوية للحركة الفردية لنطف الكباش بتقدم مدة الخزن بالتبريد (5 م) والى اليوم الخامس من الخزن (جدول 1) . ومن الجدير بالذكر أن مقدار الانخفاض الحاصل في الحركة الفردية للنطف بتقدم الايام كان في مجموعة السيطرة أعلى منه في المجاميع المعاملة باللاكتوفيرين. بينت الدراسة الحالية وجود تفوق معنوي (P≤0.05) في الحركة الفردية للنطف في المعاملات التي اضيف لها بروتين اللاكتوفيرين وكالاتي : المعاملة الاولى 400 ملغم /لتر والمعاملة الثانية 800 ملغم /لتر والمعاملة الثالثة 1200 ملغم /لتر مقارنة مع معاملة السيطرة ، وهذا التفوق الحاصل في الحركة الفردية للنطف يمكن ان يفسر بارتباط بروتين الالكتوفيرين بالمواقع الفعالة في النطف وبذلك يوفر العوامل التي تسهم في زيادة حركة النطف نتيجة لزيادة الطاقة التي يوفرها مصدر البروتين (16). وتفوقت المعاملة الثالثة معنويا (P≤0.05) في النسبة المئوية لحركة النطف الفردية نتيجة لوجود تراكيز كبيرة من بروتين اللاكتوفيرين وهذا الذي فسره (Zumoffen واخرون، 2013) (25) أذ اوضح ان تراكيز اللاكتوفيرين المرتفعة لم تؤثر في تقليل الحركة بالنسبة للنطف في زيادة مدة الخزن. و اظهرت النتائج التفوق المعنوي (P≤0.05) في الحركة الفردية طول فترة الحفظ بالتبريد وهذا مايمكن تفسيره بأن بروتين اللاكتوفيرين اعطى حماية للنطف من البكتريا الضارة بالنطف ومن ثم عدم التصاق وتراص النطف (24). أتضح من نتائج الدراسة الحالية أن احلال بروتين اللاكتوفيرين كمضاد حيوي في مخففات السائل المنوي بدلا من المضادات الحيوية المعتادة لم يؤثر في حدوث تلف في الغشاء البلازمي للنطف (جدول 2) ، وخلال مدد الحفظ المختلفة في التبريد. أذ بلغت النسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي للنطف في اليوم الاول من الحفظ 90.00 ± 1.57 ، 90.50 ± 1.38 ، 88.33 ± 2.21 و87.83 ± 2.24 % ولليوم الثاني 79.67 ± 2.57 ، 75.83 ± 4.68 ، 82.50 ± 2.50 و 83.67 ± 1.02 % ولليوم الثالث 69.50 ± 3.09 ، 70.17 ± 3.66 ، 72.50 ± 3.35 و 73.33 ± 3.57

% ولليوم الخامس 56.67 ± 8.33 ، 60.00 ± 5.00 ، 53.75 ± 3.75 و 57.20 ± 5.13 % للمعاملات السيطرة، T1 , T2 , T3 على الترتيب (جدول 2). أما في اليوم الرابع بعد التخفيف فقد بينت النتائج (جدول 2) أن المعاملة باللاكتوفيرين بتركيز 800 ملغم / لتر أدت الى حصول انخفاض معنوي في النسبة المئوية للنطف السليمة الغشاء البلازمي عند الحفظ بالتبريد في اليوم الرابع للمعاملة الثانية (T2) أذ بلغت 53.33 ± 6.01 % مقارنة بالمعاملة الاولى والثالثة (جدول 2). كما أتضح أنه بتقدم مدة حفظ السائل المنوي المخفف بالتبريد تقل اعداد النطف التي تمتاز بقابيلتها على الاحتفاظ بالغشاء البلازمي سليما لكافة المعاملات (جدول 2). وهذا مابينته نتائج الدراسة الحالية حيث احتفظت المعاملات التجريبية التي استخدم فيها بروتين اللاكتوفيرين وبكل التراكيز بسلامة الغشاء البلازمي للنطف وبذلك لم يؤثر استخدام اللاكتوفيرين كمضاد حيوي سلبيا على سلامة الغشاء البلازمي للنطف طول ايام الحفظ بالتبريد ويمكن تفسير هذه النتائج على ان هذه المادة البروتينية تقلل من التغيرات الحاصلة في سلامة الغشاء البلازمي للنطف وايضا الوقاية من صدمة البرودة (5) .كما يمكن القول أنه ومن ضمن الوظائف التي يتصف بها اللاكتوفيرين هو قابليتة على خفض نسبة وجود أوزيادة العوامل المؤكسدة من خلال عملة كمضاد للتاكسد (antioxidant) وبذلك فأنه يعمل على تقليل حدوث التدهور الذي قد يحصل بفعل العوامل المؤكسدة وتاثيرها على غشاء خلية النطفة (1). كذلك بينت نتائج الدراسة حدوث انخفاض معنوي (P≤0.05) في سلامة الغشاء البلازمي للنطف عند التقدم في الوقت في أثناء مدة الحفظ بالتبريد لجميع المعاملات وبضمنها مجموعة السيطرة والتي قد يعود السبب العمليات الفنية (التكنيك) او حصول تجمع للبروتينات بفعل الخزن الطويل على جدار خلية النطفة وبذلك تعمل على تقليل خاصية النفاذية للغشاء البلازمي في تنظيم دخول وخروج السوائل (16). لم تظهر نتائج التحليل الاحصائي وجود اختلافات معنوية (P< 0.05) في النطف المشوهة عند المعاملة باللاكتوفيرين مقارنة بمجموعة السيطرة (جدول 3) اذ بلغت النسبة المئوية للنطف المشوهة بعد الحفظ بيوم واحد 8.33 ± 1.36 ، 8.50 ± 2.14 ، 9.33 ± 0.61 و7.67 ± 1.31 % ولليوم الثاني 13.00 ± 2.23 ، 14.67 ± 3.32 ، 15.33 ± 2.01 و11.17 ±0.31 % ولليوم الثالث 18.33 ± 2.65 ، 23.50 ± 3.67 ، 23.33 ± 4.01 و 24.67 ± 3.43 % ولليوم الخامس 34.00 ± 7.02 ، 31.67 ± 1.66 ، 39.50 ± 5.50 و 32.40 ± 2.50 % للمعاملات مجموعة السيطرة T1 , T2 , T3 على التوالي. بينما وجد ان نسبة التشوهات في نطف الكباش كانت مرتفعة (P< 0.05) في المعاملة T2 مقارنة بالمعاملة T1 (جدول 3). ومن الواضح ان لمدة حفظ السائل المنوي بالتبريد (اليوم) تاثيرا عالي المعنوية (P<0.01) في ارتفاع نسبة التشوهات لنطف كباش في التجربة الحالية (جدول 3) اذ بلغت اعلاه في اليوم الخامس من الحفظ بالتبريد والتي كانت 34.00 ± 7.02 ، 67 ± 1.66 ، 39.50 ± 5.50 و32.40 ± 2.50 % لمجموعة السيطرة والمعاملاتT1 , T2 , T3 على التوالي وهذا اتضح لنا في الدراسة الحالية اذ اظهرت النتائج ان استخدام بروتين اللاكتوفيرين كمضادا حيويا في مخففات السائل المنوي في المعاملات التجريبية الثلاثة مقارنة مع معاملة السيطرة لم تظهر فروقا معنوية (P≤0.05) في النسبة المئوية للنطف المشوهة ويمكن تفسير هذه النتائج بان بروتين اللاكتوفيرين يوفر طبقة حماية للنطف عند مدة الحفظ بالتبريد من العوامل التي تضر بالنطف ولاسيما في منطقة رأس النطفة ومنطقة الذيل، كما ان بروتين31. اللاكتوفيرين يؤدي دورا مهما في القضاء على انواع البكتريا الضارة التي عند وجودها تلتصق في اماكن متعددة من النطفة وبالذات منطقة الرأس والقطعة الوسطية والذيل وبهذا سوف تسبب تشوهات وضرر للنطف في اثناء مدة الخزن (21). كذلك لم يتضح وجود تاثير معنوي (P< 0.05) للاضافة الالكتوفيرين لمخففات السائل المنوي بالنسب المستخدمة في هذه الدراسة على النسبة المئوية للنطف الحية لليوم الاول والثاني والثالث بعد التخفيف (جدول 4) . اذ بلغت هذه النسبة اذ بلغت هذه النسبة لليوم الاول (92.83 ± 1.27 ، 91.67 ± 1.17 ، 92.16 ± 1.70 و 91.17 ± 1.40 %) واليوم الثاني (84.83 ± 2.57 ، 86.17 ± 2.94 ، 87.33 ± 1.58 و 88.17 ± 1.19 %) واليوم الثالث (79.67 ± 1.67 ، 81.00 ± 2.81 ، 78.67 ± 2.03 و81.66 ± 2.75 %) واليوم الخامس (65.67 ± 6.98 ، 67.66 ± 3.93 ، 63.25

± 1.97 و63.80 ± 4.29 %) لمجموعة السيطرة ، T1 ، T2 ، T3 على التوالي في حين نلاحظ حصول تغاير في النسبة المئوية للحايمن الحية بين المعاملات التجريبية في اليوم الرابع بعد التخفيف (جدول 4). تمتلك اغلب البروتنات ومن ضمنها بروتينات الموجودة في السائل المنوي عدة خواصا ومن اهمها خاصية مضادة الاكسدة (antioxidant) وكذلك بروتين الاكتوفرين له خاصية ضد العوامل المؤكسدة وبهذا فان نسبة النطف الحية تزداد في عينات السائل المنوي الذي يحتوي على اللاكتوفيرين (11). ويمكن تفسير ارتفاع نسبة النطف الحية عند معاملة السائل المنوي المخفف ببروتين اللاكتوفيرين من خلال:

1- حافظ بروتين اللاكتوفيرين على النطف من فعل البكتريا الضارة التي تعمل على ازاحة طبقة (phosphatidylserine) في الغشاء البلازمي للنطف ومن ثم المحافظة قدر الامكان على سلامة النطف وعدم موتها في أثناء مدة الحفظ (23).

2-ان بروتين اللاكتوفيرين يعد مصدر طاقة اضافي للنطف وبذلك تكون النطف في افضل نشاطها مما يؤدي الى ارتفاع نسبة النطف الحية (19).

جدول 1. تأثير المعاملة باللاكتوفيرين والوقت بعد التخفيف في النسبة المئوية للحركة الفردية لنطف الكباش (المتوسط ± الخطأ القياسي).

المعاملة	يوم بعد الجمع الاول	الثاني	الثالث	الرابع	الخامس	مستوى المعنوية
السيطرة	2.60 ± 84.67 A a	3.67 ± 66.33 B b	6.15 ± 47.50 A c	1.67 ± 18.33 B d	0.00 ± 10.00 B d	**
T1	3.61 ± 86.17 A a	3.65 ± 77.83 A a	6.79 ± 51.67 A b	12.01 ± 36.67 AB bc	6.01 ± 28.33 A c	**
T2	2.21 ± 88.50 A a	2.26 ± 76.33 A b	4.01 ± 56.67 A c	8.82 ± 36.67 AB d	2.50 ± 12.50 B e	**
T3	2.04 ± 87.33 A a	1.83 ± 77.83 A b	3.74 ± 61.17 A c	3.24 ± 53.40 A c	2.45 ± 19.00 AB d	*
مستوى المعنوية	NS	*	NS	*	**	---

المتوسطات التي تحمل حروفا كبيرة ضمن العمود الواحد (بين المعاملات) وحروفا صغيرة ضمن الصف الواحد (بين الايام) تختلف معنويا فيما بينها.
* (P<0.05) ، ** (P<0.01) ، NS: غير معنوي.

جدول 2. تأثير المعاملة باللاكتوفيرين والوقت بعد التخفيف في النسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي للنطف (HOST%) (المتوسط ± الخطأ القياسي)

المعاملة	يوم بعد الجمع الاول	الثاني	الثالث	الرابع	الخامس	مستوى المعنوية
السيطرة	1.57 ± 90.00 A a	2.57 ± 79.67 A ab	3.09 ± 69.50 A bc	1.67 ± 61.67 AB cd	8.33 ± 56.67 A d	**
T1	1.38 ± 90.50 A a	4.68 ± 75.83 A b	3.66 ± 70.17 A bc	1.67 ± 68.33 A bc	5.00 ± 60.00 A c	**
T2	2.21 ± 88.33 A a	2.50 ± 82.50 A a	3.35 ± 72.50 A b	6.01 ± 53.33 B c	3.75 ± 53.75 A c	**
T3	2.24 ± 87.83 A a	1.02 ± 83.67 A a	3.57 ± 73.33 A b	3.34 ± 66.80 A b	5.13 ± 57.20 A c	**
مستوى المعنوية	NS	NS	NS	*	NS	---

المتوسطات التي تحمل حروفا كبيرة ضمن العمود الواحد (بين المعاملات) وحروفا صغيرة ضمن الصف الوحد (بين الايام) تختلف معنويا فيما بينها.
* (P<0.05)، ** (P<0.01)، NS: غير معنوي.

جدول 3. تأثير المعاملة باللاكتوفيرين والوقت بعد التخفيف في النسبة المئوية للنطف المشوهة (المتوسط ± الخطأ القياسي)

المعاملة	يوم بعد الجمع الاول	الثاني	الثالث	الرابع	الخامس	مستوى المعنوية
السيطرة	1.36 ± 8.33 A d	2.23 ± 13.00 A cd	2.65 ± 18.33 A bc	4.00 ± 26.00 AB ab	7.02 ± 34.00 A a	**
T1	2.14 ± 8.50 A c	3.32 ± 14.67 A bc	3.67 ± 23.50 A b	5.17 ± 20.33 B ab	1.66 ± 31.67 A a	**
T2	0.61 ± 9.33 A c	2.01 ± 15.33 A bc	4.01 ± 23.33 A b	5.36 ± 37.67 A a	5.50 ± 39.50 A a	**
T3	1.31 ± 7.67 A b	0.31± 11.17 A b	3.43 ± 24.67 A a	4.37 ± 24.60 AB a	2.50 ± 32.40 A a	**
مستوى المعنوية	NS	NS	NS	*	NS	---

المتوسطات التي تحمل حروفا كبيرة ضمن العمود الواحد (بين المعاملات) وحروفا صغيرة ضمن الصف الواحد (بين الايام) تختلف معنويا فيما بينها.
* (P<0.05)، ** (P<0.01)، NS: غير معنوي.

جدول 4. تأثير المعاملة باللاكتوفيرين والوقت بعد التخفيف في النسبة المئوية للنطف الحية (المتوسط ± الخطأ القياسي)

المعاملة	يوم بعد الجمع الاول	الثاني	الثالث	الرابع	الخامس	مستوى المعنوية
السيطرة	1.27 ± 92.83 A a	2.57 ± 84.83 A ab	1.67 ± 79.67 A bc	2.33 ± 75.33 AB c	6.98 ± 65.67 A d	**
T1	1.17 ± 91.67 A a	2.94 ± 86.17 A ab	2.75 ± 81.66 A b	1.00 ± 81.00 A b	3.93 ± 67.66 A c	**
T2	1.70 ± 92.16 A a	1.58 ± 87.33 A a	2.03 ± 78.67 A b	3.05 ± 66.00 B c	1.97 ± 63.25 A c	**
T3	1.40 ± 91.17 A a	1.19 ± 88.17 A ab	2.81 ± 81.00 A bc	2.94 ± 74.60 AB c	4.29 ± 63.80 A d	**
مستوى المعنوية	NS	NS	NS	*	NS	---

المتوسطات التي تحمل حروفا كبيرة ضمن العمود الواحد (بين المعاملات) وحروفا صغيرة ضمن الصف الوحد (بين الايام) تختلف معنويا فيما بينها.
* (P<0.05)، ** (P<0.01)، NS: غير معنوي.

REFERENCES

1.Ashworth PJC, Harrison RAP, Miller NGA, Plummer JM .and Watson PF. 1994. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. Reprod Fertil Dev; 6:173–180.

2.Azawi, O. I. and Ismaeel, M. A. 2012. “Influence of Addition of Different Antibiotics in Semen Diluent on Viable Bacterial Count and Spermatozoal Viability of Awassi Ram Semen,” Veterinary World (5) 75-79.

3.Baker, E. N. and H. M. Baker. 2005. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. Cell Mol. Life Sci. 62(22):2592-30.

4.Brock, J. H. 2002. The physiology of lactoferrin. Biochem. Cell Biol. 80:1-6.

5.Diemer, T., Huwe, P., Michelmann, H.W., Mayer, F., Schiefer, H.G., and Weidner, W., 2000. Escherichia coli-induced alterations of human spermatozoa. An electron microscopy analysis. Int. J. Androl. 23, 178–186.

6.Farnaud, S. and R. W. Evans. 2003. Lactoferrin--a multifunctional protein with antimicrobial properties. Mol. Immunol. 40:395-405.

7.Hancock, J.L.1951. Attaining technique for the study of temperature shock in semen. Nature .Land .167:323-324.

8.Jeyendran, R. S.; Vander van, H. H.; Perez-Pelaez, M.; Crabo, B. G.and Zaneveld, L. J. D.1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J. Reprod. Fertile. 70, 219-228.

9.Legrand, D., A. Pierce, E. Elass, M. Carpentier, C. Mariller and J. Mazurier. 2008. Lactoferrin structure and functions. Adv. Exp. Med. Biol. 606:163-194.

10.Mason, P. L., J. F. Heremans and C. Dive. 1966. An iron-binding protein common to many external secretions. Clin. Chim. Acta. 14:735-739.

11.Monika Fraczek, and Maciej Kurpisz 2015 . Mechanisms of the harmful effects of bacterial semen infection on ejaculated human spermatozoa: potential inflammatory markers in semen. fhc.viamedica.pl. Vol. 53, No. 3, 2015 .pp. 201–217.

12.OIE. 2008. World Organization for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6th ed.pp:

13.Salamon, S., and Maxwell, W.M.C., 2000. Storage of ram semen. Anim. Reprod. Sci. 62, 77–111.

14.SAS.2011. SAS/ STAT Users Guide for Personal Computers. SAS Institute, .Inc.Cary, N.C.USA.

15.Shin, S. J., Lein, D. H., Patten, V. H. and Ruhnke, H. L. 1988. “A New Antibiotic Combination for Frozen Bovine Semen I. Control of Mycoplasmas, Ureaplasmas Campylobacter Fetus Ssp. Venerealis and Haemophilus Somnus in Frozen Bovine Semen,” Theriogenology (29) 577-591.

16.Smith, D.G.; Senger, P.L.; Mc cutchan, J.F. and C.A.LANDA. 1979. Selenium and Glutathione Peroxidase Distribution in Bovine Semen and Selenium-75 Retention by the Tissues of the Reproductive Tract in the bull.Bio.Rep.,20:377-383.

17.Sorensen, M. and S. P. L. Sorensen. 1939. The proteins in whey. C.R. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Chim. 23:55.

18.Swanson, E.W. and Beardon, H.J.1951. An eosin nigrosin stain differentiating live and

dead bovine spermatozoa. J. Anim .Sci. 10: 981-987.
19.Villegas J, Schulz M, Soto L, Sanchez R. 2005. Bacteria induce expression of apoptosis in human spermatozoa. Apoptosis. 10:105–110.PMID: 15711926.
20.Walton,A. 1933. Techniqueof artificial insemination .Mp. Bur. Anim.Genet, 56, Iiius – Edinburgh.
21.Watson, P.F and Anderson, W.J.1983. Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cod shock .J. Reprod. Fertile, 69(1):229-235.
22.Yaniz, J. L., Marco-Aguado, M. A., Mateos, J. A.and Santolaria P. 2010. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15 °C. Anim. Reprod. Sci. , (122): 142-149.
23.Zumoffen C, Caille A, Munuce MJ, Cabada M and Ghersevich S. 2010. Proteins from human oviductal tissue conditioned medium modulate sperm capacitation. Hum Reprod 25, 1504–1512.
24.Zumoffen CM, E. Massa, A. M. Caille, M. J. Munuce and S. A. Ghersevich .2015. Effects of lactoferrin, a protein present in the female reproductive tract, on parameters of human sperm capacitation and gamete. ANDROLOGY, 20-Jul-2015.
25.Zumoffen CM, Gil R, Caille AM, Morente C, Munuce MJ and Ghersevich SA. 2013.. A protein isolated from human oviductal tissue in vitro secretion, identified as human lactoferrin, interacts with sperm and oocytes and modulates gamete interaction. Hum Reprod 28, 1297–1308.