تأثير إضافة الكارنتين والاينوستول إلى مخفف Tris في نوعية السائل المنوي بعد التجميد لثيران الهولشتاين

طلال أنور عبد الكريم*، عمر عادل محمد**، عبد الله محمد حسن شبر*، فارس فيصل إبراهيم** ووفاء يدام لطيف**

*قسم الثروة الحيوانية/ كلية الزراعة – جامعة بغداد

**قسم التلقيح الاصطناعي/ وزارة الزراعة

الخلاصة

أُجريت هذه الدراسة في قسم التلقيح الاصطناعي في أبو غريب التابع لدائرة الثروة الحيوانية/ وزارة الزراعة للمدة من تشرين الأول 2012 ولغاية شباط 2013 بهدف بيان تأثير إضافة الكارنتين والاينوستول إلى مخفف Tris لتحسين خصائص نطف ثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدد مختلفة. أُستعمل في هذه الدراسة سبعة ثيران هولشتاين بالغة بأعمار تتراوح ما بين 2.5– 3 سنة، وتم جمع السائل المنوي منها بواسطة المهبل الاصطناعي بواقع قذفة/ ثور/ أسبوع وإجراء الفحوصات اللازمة لتقييمه، ومن ثم تم تجميعه للثيران جميعها (Pooled semen) وتقسيمه بالتساوي على المعاملات المختلفة في التجربة باستخدام مخفف Tris. أضيف الكارنيتن (7.5 ملي مول) والاينوستول(7.5 ملي مول) إلى المجموعتين الثانية والثالثة على التوالي، في الوقت الذي استخدم فيه مخفف Tris فقط للمجموعة الأولى (مجموعة سيطرة). تم دراسة كل من الحركة الفردية للنطف والنسبة المئوية لكل من النطف الحية والتشوهات الكلية والاكروسوم السليم على مدد زمنية مختلفة (بعد التبريد على درجة حرارة 5°م وبعد 48 ساعة وشهر وشهرين وثلاثة اشهر من الحفظ بالتجميد). أدت إضافة كل من الكارنتين والاينوستول إلى زيادة معنوية($P\leq0.05$) في النسبة المئوية لحركة النطف الفردية بعد الشهر الثالث من الحفظ بالتجميد عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة، كما أدى إضافة الكارنتين إلى زيادة واضحة ($P\leq0.05$) في النسبة المئوية للنطف الحية بعد الشهر الثالث من الحفظ بالتجميد مقارنةً مع مجموعة السيطرة ومجموعة الاينوستول. من ناحية أخرى، أدت إضافة كل من الكارنتين والاينوستول إلى انخفاض معنوي($P\leq0.05$) في النسبة المئوية لنسبة التشوهات الكلية مقارنةً بمجموعة السيطرة طيلة المدد الزمنية قيد الدراسة. كان لكل من الكارنتين والاينوستول تأثيراً معنوياً ($P\leq0.05$) في زيادة النسبة المئوية للاكروسوم السليم قياساً بمجموعة السيطرةخلال المدد الزمنية جميعها. يمكن الاستنتاج ان إضافة الكارنتين والاينوستول إلى مخفف Tris حسن من خصائص نطف ثيران الهولشتاين بعد الحفظ التجميد من خلال دورهما كعاملان مضادان للأكسدة من جهة وعاملان واقيان من ضرر التجميد من جهة أخرى، مما سينعكس إيجابياً في زيادة نسبة الأخصاب والحمل لدى الأبقار الملقحة بهذا السائل المنوي.

الكلمات المفتاحية: كارنتين، اينوستول، سائل منوي، حفظ بالتجميد، ثيران.

E-mail: omaradel19812007@yahoo.com

Effect of adding carnitine and inositol to Tris extender on post-cryopreservative semen quality of Holstein bulls

T. A. Abdulkareem*, O. A. Mohamed, A. M. H. Shubber*, F. F. Ibrahim** and W.Y. Lataf****

***Department of Animal Resources/ College of Agriculture- University of Baghdad**

****Department of Artificial Insemination/ Ministry of Agriculture**

Abstract

This study was undertaken at the Department of Artificial Insemination, Abu-Ghraib belong to the Directorate of Animal Resource, Ministry of Agriculture, during the period from October 2012 to February 2013 to investigate the effect of

addingcarnitine and inositol to Tris extender on post-cryopreservative semen characteristics forHolstein bulls following different periods. Seven mature bulls of 2.5-3 years old were used in this study. Semen was collected via artificial vagina in one ejaculate per bull per week for the 7 weeks experimental period. The evaluations were performed for fresh semen, and thereafter, pooled, and subdivided to different experimental groups by diluting with Tris-based extender. Carnitine (7.5 mM), inositol (7.5 mM) were added to Tris extender in the second and third groups, while the Tris was added only to the control group.Sperm cell individual motility, live sperm cells percentage, total sperm abnormalities percentage along with the acrosome integrity percentage were investigated following different periods (cooling at 5 °C, 48 hrs, 1, 2 and 3 months post cryopreservation, PC). Adding of carnitine and inositol had significantly($P\leq 0.05$) increased the sperm cell individual motility, three months PC as compared with the control group. Carnitine had increased ($P\leq 0.05$) live sperm cells percentage, three months PC in comparison with both control and Inositol groups. On the other hand, adding of carnitine and inositol decreased ($P<0.05$) total sperm cells abnormality percentage as compared with control group throughout the all PC experimental periods. Higher ($P\leq 0.05$) acrosome integrity percentage was resulted by adding carnitine and inositolduring all preservation periods as compared with the control group. In conclusion, adding of carnitine and inositol to Tris extenderimproved the PC semen characteristics of Holstein bulls through their pivotal role as antioxidant and cryoprotectant agents. These will certainly enhance the conception and pregnancy rates of inseminated cows.

Key words: Carnitine, Inositol, Semen, Cryopreservation, Bulls.

المقدمة

تستخدم عملية حفظ نطف الثيران بالتجميد بشكل واسع باعتبارها أداة حيوية في قطاع الثروة الحيوانية من خلال مساهمتها في حفظ المصادر الوراثية وإنتاج حيوانات متميزة في إنتاجيتها (1). ومع ذلك فأن عملية الحفظ بالتجميد تؤدي إلى ضرر إضافي قاتل للنطف متمثلاً بفقدان حركتها وحيويتها وقابليتها الاخصابية وحدوث تدهور في سلامة الاكروسوم والغشاء البلازمي للنطفة فضلاً عن حدوث أضرار في المادة الوراثية DNA (2،3،4). وقد يعزى سبب حدوث هذا الضرر أثناء عملية الحفظ بالتجميد إلى صدمة البرودة وتشكيل البلورات الثلجية والجهد التأكسدي وتغيير الضغط الاوزموزي وإعادة تنظيم البروتينات الدهنية داخل أغشية الخلايا (5،6). ان التحرر المستمر لأنواع الأوكسجين الفعال (Reactive oxygen species, ROS) من قبل النطف المشوهة وغير الناضجة وكذلك الناتج عن عمليات تجميد وإسالة السائل المنوي غالباً ما يرافقه انخفاض تركيز مضادات الأكسدة في البلازما المنوية وكذلك في مخففات السائل المنوي مما يؤدي إلى إحداث جهد تأكسدي على النطفة (7، 8). وقد لوحظ في الآونة الأخيرة ان الأحماض الأمينية تلعب دوراً مهماً كمضادات أكسدة فعالة لخلايا النطفة عند إضافتها لمخففات السائل المنوي لبعض الحيوانات الزراعية (1، 9)، إذ يعد الكارنتين (Carnitine) بمثابة توليفة حيوية من حامضيين أمينيين رئيسين وهما اللايسين (Lysine) والمثيونين (Methionine) ويتكون في الكبد والكلى والدماغ وهو مركب شبيهه بالفيتامين يتواجد أيضاً بتراكيز كبيرة في بربخ ونطف الثدييات ويؤدي دوراً في توليد طاقة التمثيل الغذائي، من خلال تسهيل نقل الأحماض الدهنية إلى المايتوكوندريا(10)، وبالتالي تحصل خلايا البربخ والنطف على الطاقة بمساعدة الكارنتين المتواجد في السائل البربخي (Epididymal fluid) (11، 12). وقد استخدم الكارنتين في مخففات النطف لغرض تحسين صفات السائل المنوي في ثيران Simmental (1) وذكور الماعز(10). من جانب آخر، يؤدي الاينوستول دوراً مهماً في الحفاظ على حيوية وديمومة الخلايا الظهارية وخلايا النطف في البربخ بوصفه عامل نمو أساس (13). وقد تبين ان حركة النطف الفردية المحفوظة بالتجميد

تتحسن عند إضافة الاينوستول إلى مخففات النطف في الثيران (14) وذكور الماعز(10). ونظراً لأهمية هذين الحامضين الأمينيين (الكارنتين والاينوستول) في الحفاظ على خلايا النطف من الأثر الضار للتجميد الناتج عن وجود الجذور الحرة ولعدم وجود دراسة سابقة في العراق والعالم تعنى بتأثير إضافتهما إلى مخفف Tris في خصائص السائل المنوي لثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدد زمنية مختلفة فقد أجريت الدراسة الحالية.

المواد وطرائق العمل

- **حيوانات التجربة وجمع السائل المنوي:** أجريت هذه الدراسة في قسم التلقيح الاصطناعي التابع لدائرة الثروة الحيوانية/ وزارة الزراعة للمدة من تشرين الأول 2012 ولغاية شباط 2013. أستخدم في هذه التجربة 7 ثيران مدربه على جمع السائل المنوي باستخدام المهبل الاصطناعي بأعمار تتراوح ما بين 2.5– 3 سنوات ووزن جسم بين 500 – 750 كغم. خضعت جميع الثيران لنظام تغذية موحد إذ كان يقدم لها العلف المركز يومياً بمعدل 4 كغم/ حيوان. وقد بلغ البروتين الخام في العليقة 18% وكمية الطاقة 3323 كيلو سعرة/ كيلو غرام وتكونت العليقة من 35% شعير و33% نخالة الحنطة و10% ذره صفراء و20% كسبة فول الصويا و0.5% حجر الكلس و0.5% ملح الطعام و1% فيتامينات ومعادن، بينما تألف العلف الخشن من دريس الجت وبواقع 60 كغم/ حيوان/ يوم. تم جمع السائل المنوي باستخدام المهبل الاصطناعي وتجميعه Pooled semen لزيادة حجم العينة والتخلص من الفروق الفردية للثيران. وقد بلغ عدد القذفات التي جمعت خلال مدة التجربة 98 قذفة وبمعدل 14 قذفة لكل ثور. تم وضع السائل المنوي المجمع في حمام مائي على درجة حرارة 37 لحين قياس الحركة الفردية للنطف وتركيزها.
- **تقييم وحفظ السائل المنوي والمعاملات:** سجل حجم القذفة بعد الجمع باستعمال أنابيب زجاجية مدرجة، في الوقت الذي قدرت فيه الحركة الجماعية للنطف استناداً لطريقة (15) والحركة الفردية لخلايا النطف طبقا لما جاء به (16). وحسب تركيز النطف باستخدام شريحة عد كريات الدم الحمراء Neubauer Haemocytometer Chamber حسب الطريقة التي وصفها (17). تألف مخفف Tris من 24.2 غم من مركب Tris، 13.4 غم من حامض الستريك، 10 غم من الفركتوز، 19.2% من صفار البيض، 64 مللتر من الكليسيرول (6.4%) و1000 مللتر من الماء المقطر وضبط الأس الهيدروجيني (pH) للمخفف عند 6.8. تم خلط المخفف مع السائل المنوي المجمع وتقسيمه إلى ثلاث مجاميع، عدت المجموعة الأولى بمثابة مجموعة سيطرة حاوية على مخفف Tris فقط، في الوقت الذي أضيف الكارنتين (NATROL) بتركيز 7.5 ملي مول والاينوسيتول (Qualikems Fine Chem. Pvt. Ltd.) بتركيز 7.5 ملي مول إلى المجموعتين الثانية والثالثة على التوالي. تم دراسة صفات السائل المنوي المختلفة لمدد زمنية مختلفة (بعد التبريد على درجة حرارة 5°م وبعد 48 ساعة وشهر وشهرين وثلاثة اشهر من الحفظ بالتجميد). قدرت الحركة الفردية لخلايا النطف خلال هذه المددطبقا لما جاء به (16)، في حينقدرت النسبة المئوية للنطف الميتة استناداً إلى ما جاء به (18). كما قدرت النسبة المئوية لخلايا النطف المشوهة حسب طريقة (19)، وتم الكشف عن تشوهات الاكروسوم بعد تحضير صبغة Giemsa حسب الطريقة التي وصفها (20).
- **التحليل الإحصائي:** اجري التحليل الإحصائي للنتائج باستخدام البرنامج الإحصائي SAS (21) لدراسة تأثير إضافة كل من الكارنتين والاينوسيتول إلى مخفف Tris في صفات الشائل المنوي لثيران الهولشتاين لمدد زمنية مختلفة وفق تصميم عشوائي كامل (CRD) باستعمال تجربة عاملية (3x5) وفق الأنموذج الرياضي الاتي:

$$Y_{ijk}= \mu + T_i+P_j + TP_{(ij)} + e_{ijk}$$

إذ ان:

Y_{ijk} : قيمة المشاهدة العائدة للمجموعة i (i = مجموعة الكارنتين ومجموعة الاينوستول ومجموعة السيطرة).

μ = المتوسط العام للصفة المدروسة.

T_i = تأثير المعاملة i.

P_j = تأثير فترة الحفظ بالتبريد والتجميد j .

$TP_{(ij)}$ = تأثير التداخل ما بين المعاملة والحفظ.

e_{ijk} = الخطأ القياسي.

قورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باستعمال أختبار دنكن متعدد الحدود (22) متعدد الحدود.

النتائج والمناقشة

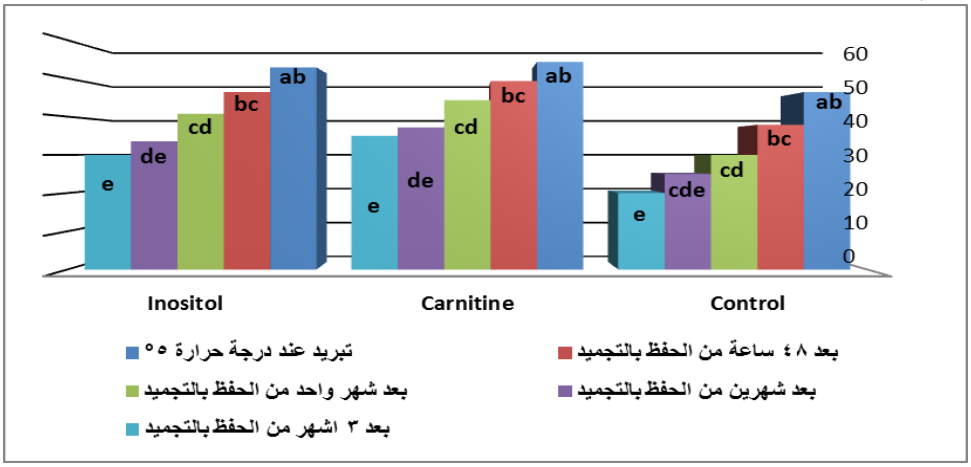
- **الحركة الفردية للنطف:** انعدمت الفروق المعنوية في النسبة المئوية للحركة الفردية للنطف عند درجة حرارة 5° (عند التبريد) بين مجاميع الكارنتين (54.29±2.76%) والاينوستول (52.86±3.59%) والسيطرة (46.43±5.31%)، في حين ازدادت ($P\leq0.05$) الحركة الفردية للنطف بعد 48 ساعة من الحفظ بالتجميد لدى مجموعة الكارنتين (49.29±2.76%) مقارنةً بمجموعة السيطرة (37.86±4.61%)، في الوقت الذي انعدم التفوق المعنوي ما بين مجموعتي الكارنتين والاينوستول للمدة نفسها (جدول 1). كانت نتائج الحركة الفردية للنطف بعد مرور شهر واحد من تجميد السائل المنوي مقاربة لما هي عليه بعد مرور 48 ساعة من تفوق معنوي ($P\leq0.05$) لمجموعة الكارنتين (44.29±2.97%) والاينوستول (40.71±3.16%) على مجموعة السيطرة (30.00±3.08%)، مع عدم وجود فروق معنويه تذكر ما بين مجموعتي الكارنتين والاينوستول (جدول 1). وبعد مرور شهرين من الحفظ بالتجميد، أظهرت النتائج زيادة معنوية ($P\leq0.05$) للحركة الفردية للنطف لدى مجموعة الكارنتين (37.14±2.40%) قياساً بمجموعة السيطرة (25.00±2.67%)، مع عدم وجود فروق معنوية ما بين مجموعتي الكارنتين والاينوستول من جهة، والاينوستول والسيطرة من جهة أخرى للمدة نفسها. وضمن السياق نفسه، كانت نتائج الحركة الفردية للنطف بعد مرور ثلاثة اشهر من الحفظ بالتجميد مماثلة لما هي عليه بعد مرور شهر واحد من تفوق معنوي ($P\leq0.05$) لمجموعة الكارنتين (35.00±2.18%) والاينوستول (30.00±3.45%) على مجموعة السيطرة (20.00±1.88%)، مع انعدام الفروق المعنوية ما بين مجموعتي الكارنتين والاينوستول للمدة نفسها (جدول 1). يؤدي الكارنتين دوراً في توليد طاقة التمثيل الغذائي، من خلال تسهيل نقل الأحماض الدهنية إلى المايتوكوندريا (1) وبالتالي فأن وجود الكارنتين يعمل على منع تكوين الجذور الحرة المكونة للبيروكسيدات المسببة للتأكسد أو انه يحطم الجذور الحرة المتكونة (23)، إذ يتشابه عمل الكارنتين في مثل هذه الحالات مع عمل فيتاميني A و E (24) وبالتالي قد يعزى سبب تحسن الحركة الفردية لنطف الذكور المضاف إليها بالكارنتين إلى دوره كمضاداً فاعلاً للأكسدة (Powerfulantioxidant) ومانع لتكوين الجذور الحرة في السائل المنوي (25). ويؤدي الاينوستول دوراً هاماً في الحفاظ على حيوية وديمومة الخلايا الظهارية وخلايا النطف في البربخ بوصفه عامل نمو أساس من خلال وجوده بتراكيز عالية في السائل البربخي (13). ان معظم اينوستول البلازما المنوية يوجد بشكل طليق، فضلاً عن احتواء كل من البلازما المنوية والنطف على كميات قليلة منه ويكون من النوع المرتبط (;BoundInositol 26). وأفاد (27) بأن اينوستول ثلاثي الفوسفات (IP3) يطلق أو يحرر أيونات الكالسيوم من بعض المخازن في النطفة، والتي تؤدي دوراً رئيسياً لتنظم كلا من حركة التنشيط وحركة التنشيط المفرط في النطف (28). وهذا ما يفسر زيادة الحركة الفردية للنطف عند إضافة الاينوستول في الدراسة الحالية. وهذا ما أكده (14) انه بإمكان الاينوستول تحسين حركة

نطف الثيران بعد الحفظ بالتجميد. أو قد يكون سبب تفوق الاينوستول، هو المحافظة على مستوى الكلوتاثيون (10)، إذ يعد الكلوتاثيون مضاد أكسدة طبيعي وقدرته على التفاعل مباشرة مع العديد من أصناف الأوكسجين الفعالة، فضلاً عن كونه مساعد للمركب Glutathione peroxidase، الذي يحفز على الحد من سُميه H_2O_2 و hydroperoxides (29، 30، 31). كان هنالك انخفاضاً معنوياً($P\leq0.05$) للنسبة المئوية للحركة الفردية باختلاف مدد الحفظ بالتبريد أو التجميد ولكل المجاميع ولاسيما للمدد من 48 ساعة إلى شهرين بعد الحفظ بالتجميد. وكان اقل انخفاض لهذه الصفة لدى مجموعة الكارنتين وأكثرها لمجموعة السيطرة (شكل1).

جدول (1) تأثير إضافة الكارنتين والاينوستول إلى مخفف Tris في النسبة المئوية للحركة الفردية لنطف ثيران الهولشتاين لمدد زمنية مختلفة من الحفظ بالتبريد والتجميد (المتوسط ± الخطأ القياسي)

المدة	معاملة السيطرة	الكارنتين	الاينوستول
تبريد عند درجة حرارة 5°	^{a}5.31±46.43	^{a}2.76±54.29	^{a}3.59±52.86
بعد 48 ساعة من الحفظ بالتجميد	^{b}4.61±37.86	^{a}2.76±49.29	^{ab}3.22±46.43
بعد شهر من الحفظ بالتجميد	^{b}3.08±30.00	^{a}2.97±44.29	^{a}3.16±40.71
بعد شهرين من الحفظ بالتجميد	^{b}2.67±25.00	^{a}2.40±37.14	^{ab}3.03±33.57
بعد 3 اشهر من الحفظ بالتجميد	^{b}1.88±20.00	^{a}2.18±35.00	^{a}3.45±30.00

***المتوسطات التي تحمل حروفا مختلفة ضمن الصف الواحد تختلف معنويا ($P\leq0.05$).**



شكل(1) تأثير المدد الزمنية المختلفة من الحفظ بالتبريد والتجميد في النسبة المئوية للحركة الفردية لنطف ثيران الهولشتاين بعد إضافة الكارنتين والاينوستول إلى مخفف Tris

*** الأحرف المختلفة ضمن المعاملة الواحدة تختلف معنويا ($P\leq 0.05$).**

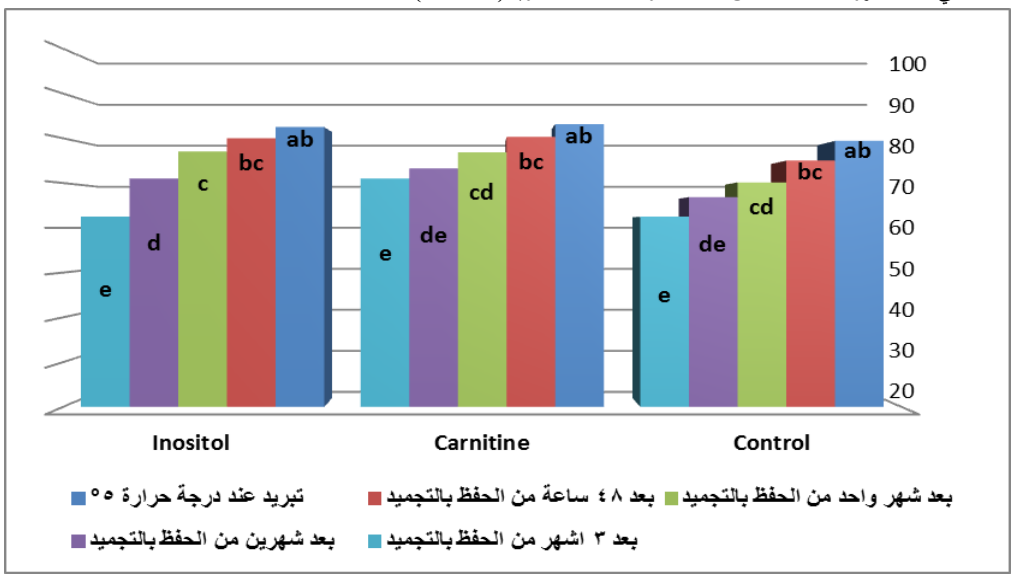
- **النسبة المئوية للنطف الحية:** أظهرت مجموعة الكارنتين تفوقاً معنوياً ($P\leq0.05$) بعد مرور 48 ساعة من الحفظ بالتجميد في نسبة النطف الحية (80.27±0.87%) مقارنةً بمجموعة السيطرة، في الوقت الذي انعدمت فيه الفروق المعنوية ما بين مجموعتي الكارنتين والاينوستول وللمدة نفسها (جدول 2). وبعد مرور شهر واحد من الحفظ بالتجميد، ازدادت النسبة المئوية للنطف الحية معنوياً ($P\leq0.05$) لدى مجموعتي الكارنتين (76.81±1.46%) والاينوستول (77.00±1.81%) قياساً بمجموعة السيطرة (جدول 2)، فيما استمر تفوق مجموعة الكارنتين بشكل واضح ($P\leq0.05$) على مجموعة السيطرة بعد مرور شهرين و ثلاثة اشهر من الحفظ بالتجميد (جدول 2). حسنت إضافة الكارنتين والاينوسيتول إلى مخفف Tris بشكل معنوي من نسبة النطف الحية لثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد، ان التحسن الحاصل من خلال إضافة الكارنتين قد يعزى لدوره كمضاد للأكسدة من خلال تسهيل نقل الأحماض الدهنية إلى المايتوكوندريا (1)، إذ يتشابه عمله في مثل

هذه الحالات مع عمل فيتاميني A و E (24) مما يقلل من الأثر الضار لأكسدة الدهون. انخفضت النسبة المئوية للنطف الحية معنوياً (P≤0.05) مع زيادة مدة الحفظ بالتبريد والتجميد ولكلا المجاميع خلال المدة بين 48 ساعة وشهرين من الحفظ بالتجميد. وباستثناء مجموعة الاينوستول التي انخفضت فيها نسبة النطف الحية معنوياً (P≤0.05) ما بين الشهر الثاني والثالث من الحفظ بالتجميد، لم يكن ذلك معنوياً للمجموعتين الباقيتين (شكل 2).

جدول (2) تأثير إضافة الكارنتين والاينوستول إلى مخفف Tris في النسبة المئوية للنطف الحية لثيران الهولشتاين لمدد زمنية مختلفة من الحفظ بالتبريد والتجميد (المتوسط ± الخطأ القياسي)

المدة	معاملة السيطرة	الكارنتين	الاينوستول
تبريد عند درجة حرارة 5°	^{a}2.24±79.40	^{a}1.12±83.15	^{a}1.31±82.48
بعد 48 ساعة من الحفظ بالتجميد	^{b}1.82±75.00	^{a}0.87±80.27	^{ab}1.59±79.97
شهر واحد من الحفظ بالتجميد	^{b}1.56±70.14	^{a}1.46±76.81	^{a}1.81±77.00
بعد شهرين من الحفظ بالتجميد	^{a}1.77±66.84	^{b}1.76±73.26	^{ab}1.42±71.01
بعد 3 اشهر من الحفظ بالتجميد	^{b}1.18±62.47	^{a}1.57±71.01	^{b}1.81±62.47

*المتوسطات التي تحمل حروفا مختلفة ضمن الصف الواحد تختلف معنويا (P≤ 0.05).



شكل (2) تأثير المدد الزمنية المختلفة من الحفظ بالتبريد والتجميد في النسبة المئوية للنطف الحية لثيران الهولشتاين بعد إضافة الكارنتين والاينوستول إلى مخففTris

*الأحرف المختلفة ضمن المعاملة الواحدة تختلف معنويا (P≤ 0.05).

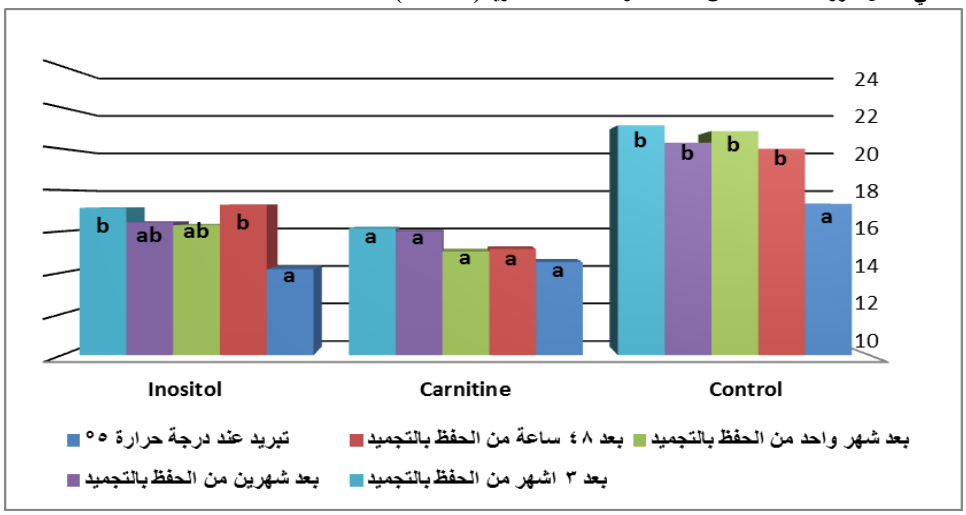
- **النسبة المئوية لتشوهات النطف:** أظهرت النتائج انخفاضاً معنوياً (P≤0.05) لمجموعتي الكارنتين والاينوستول (14.50±0.61 و 14.16±1.13% على التوالي) مقارنةً بمجموعة السيطرة (17.33±1.22%) في النسبة المئوية للتشوهات الكلية للنطف عند درجة حرارة 5°، كما انخفضت هذه النسبة معنوياً (P≤0.05) لدى مجموعتي الكارنتين والاينوستول قياساً بمجموعة السيطرة بعد مرور 48 ساعة بعد الحفظ بالتجميد (جدول 3). وضمن السياق نفسه، انخفضت النسبة المئوية للتشوهات الكلية للنطف معنوياً (P≤0.05) في مجموعتي الكارنتين والاينوستول (15.02±0.94 و 16.29±0.42% على التوالي) مقارنة بمجموعة السيطرة (20.86±1.07%) بعد شهر واحد من الحفظ بالتجميد مع انعدام الفروق المعنوية بين مجموعتي الكارنتين والاينوستول وللمدة نفسها (جدول 3). وقد كانت نتائج هذه النسبة بعد مرور شهرين مماثلة

لنظيراتها بعد مرور شهر من الحفظ بالتجميد بانخفاض معنوي ($P\leq0.05$) لمجموعتي الكارنتين والاينوستول (16.00±0.30 و 16.43±0.86% على التوالي) مقارنة بمجموعة السيطرة (20.29±0.52%). واستمر هذا الانخفاض ($P\leq0.05$) لمجموعتي الكارنتين والاينوستول بعد مرور ثلاثة اشهر من الحفظ بالتجميد على معاملة السيطرة (جدول 3). كان لكل من الكارنتين والاينوسيتول تأثيراً واقياً من الأثر الضار للتجميد انعكس في خفض نسبة التشوهات الكلية للنطف. وهناك عوامل مختلفة تؤدي إلى تعقيد عملية حفظ النطف بالتجميد، كالإجهاد الميكانيكي والكيمياحيوي والأوكسجين المشتق من الجذور الحرة والحساسية العالية من تغير الضغط الاوزموزي وعمليات التبريد والتجميد والإسالة التي تؤدي في النهاية إلى إحداث أضرار (32). وهذا ما استنتجه (1) حين أوصى بأن استخدام الأحماض الأمينية كمضادات الأكسدة قبل عملية الحفظ بالتجميد تعمل على تسهيل تعزيز هذه التقانة بشكل فاعل، وهذا ما تؤكده نتائج الدراسة الحالية من تقليل نسبة تشوهات النطف مقارنة بمجموعة السيطرة. لم تختلف النسبة المئوية لتشوهات النطف الكلية لدى مجموعة الكارنتين بمرور فترة الحفظ بالتبريد والتجميد، في الوقت الذي ازدادت فيه هذه النسبة معنوياً ($P\leq0.05$) ما بين الحفظ بالتبريد والمدة 1–3 شهر لمجموعة السيطرة وبعد 48 ساعة وثلاثة اشهر لدى مجموعة الاينوستول (شكل 3).

جدول (3) تأثير إضافة الكارنتين والاينوستول إلى مخفف Tris في النسبة المئوية لتشوهات النطف الكلية لثيران الهولشتاين لمدد زمنية مختلفة من الحفظ بالتبريد والتجميد (المتوسط ± الخطأ القياسي)

المدة	معاملة السيطرة	الكارنتين	الاينوستول
تبريد عند درجة حرارة 5°	^{a}1.22±17.33	^{b}0.61±14.50	^{b}1.13±14.16
بعد 48 ساعة من الحفظ بالتجميد	^{a}1.21±20.00	^{b}0.34±15.14	^{b}0.71±17.29
بعد شهر واحد من الحفظ بالتجميد	^{a}1.07±20.86	^{b}0.94±15.02	^{b}0.42±16.29
بعد شهرين من الحفظ بالتجميد	^{a} 0.52±20.29	^{b}0.30±16.00	^{b}0.86±16.43
بعد 3 اشهر من الحفظ بالتجميد	^{a}0.63±21.14	^{b}0.67±16.14	^{b}0.73±17.14

*المتوسطات التي تحمل حروفا مختلفة ضمن الصف الواحد تختلف معنويا ($P<0.05$).



شكل (3) تأثير المدد الزمنية المختلفة من الحفظ بالتبريد والتجميد في النسبة المئوية لتشوهات النطف الكلية لثيران الهولشتاين بعد إضافة الكارنتين والاينوستول إلى مخففTris

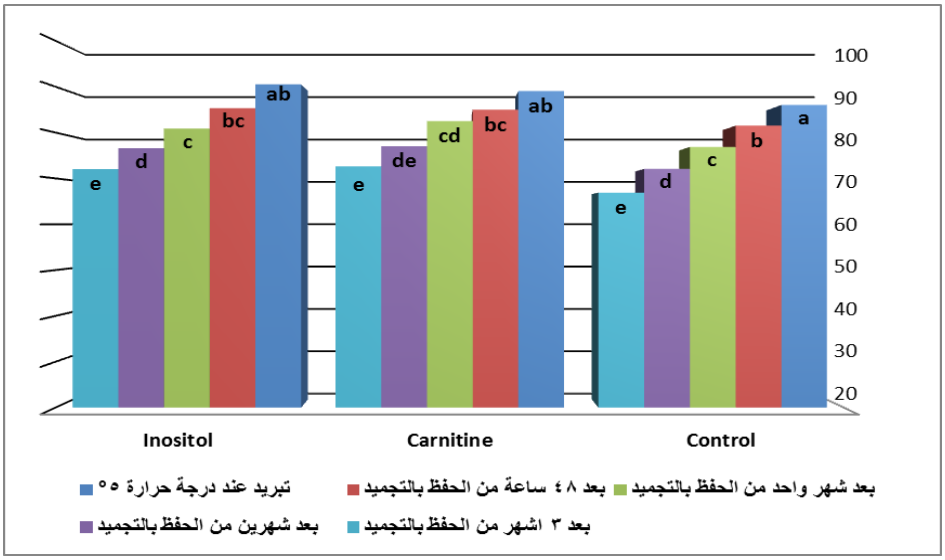
*الأحرف المختلفة ضمن المعاملة الواحدة تختلف معنويا ($P\leq 0.05$).

- **النسبة المئوية للاكروسوم السليم:** سجلت مجموعتي الكارنتين والاينوستول زيادةً معنويةً ($P\leq0.05$) في النسبة المئوية لسلامة الاكروسوم في النطف مقارنة بمجموعة السيطرة عند الحفظ بدرجة حرارة 5°م، وكذلك الحال بعد 48 ساعة من الحفظ بالتجميد، مع انعدام الفروق المعنوية بين مجموعتي الكارنتين والاينوستول عند المقارنة فيما بينهما (جدول 4). وضمن الاطار نفسه، كانت نتائج هذه النسبة بعد مرور شهر واحد من الحفظ بالتجميد مشابهة لمثيلاتها بعد 48 ساعة من الحفظ بالتجميد، إذ ازدادت معنوياً ($P\leq0.05$) لمجموعتي الكارنتين والاينوستول مقارنة بمجموعة السيطرة، مع انعدام الفروق المعنوية بين مجموعتي الكارنتين والاينوستول وللمدة نفسها (جدول 4). وبعد مرور شهرين من الحفظ بالتجميد، ارتفعت النسبة المئوية لسلامة اكروسوم النطف بشكل واضح ($P\leq0.05$) لمجموعتي الكارنتين والاينوستول (77.03±0.98 و76.56±0.48% على التوالي) على مجموعة السيطرة (72.07±0.49%)، وكذلك الحال بعد مرور ثلاثة اشهر، إذ ازدادت النسبة معنوياً ($P\leq0.05$) لمجموعتي الكارنتين والاينوستول (72.63±0.8 و72.03±0.53% على التوالي) على مجموعة السيطرة (66.89±0.7%) (جدول 4). يُعد الاكروسوم السليم من متطلبات عملية التكييف (Capacitation) والتفاعل الاكروسومي (Acrosomal reaction) واللذان يعدان خطوات حاسمة في عملية الإخصاب (33). وتوجد علاقة إيجابية معنوية ما بين النسبة المئوية للاكروسوم السليم وخصوبة نطف الثيران المحفوظة بالتجميد (34). ان الزيادة الواضحة لنسبة الاكروسوم السليم لمجموعتي الكارنتين والاينوسيتول قد يعود إلى دور هذين الحامضين الواقي من ضرر التجميد من جهة (35) ، ودوراً مضاداً للأكسدة من جهة أخرى من خلال تنشيط فعل بعض الأنزيمات مثل إنزيم الكتاليز (Catalase;36) الذي يعمل على إزالة بيروكسيد الهيدروجين، فضلا عن تثبيطه NADPH oxidase ومن ثم منع إنتاج السوبر اوكساید (Superoxide;37). كان هنالك تأثير لمدد الحفظ بالتجميد على النسبة المئوية لسلامة الاكروسوم في المجاميع المختلفة، وقد تميزت مجموعتي الكارنتين بأقل انخفاض لهذه النسبة بعد مرور شهر من الحفظ بالتجميد مقارنة بفترة 48 ساعة قياساً بالمجموعتين الباقيتين قيد الدراسة والتي انخفضت فيها هذه النسبة وبشكل معنوي ضمن المدة المذكورة (شكل4). من ناحية أخرى، انخفضت هذه النسبة معنوياً بعد مرور شهرين وثلاثة اشهر من الحفظ بالتجميد ولكل المجاميع (شكل 4).

جدول (4) تأثير إضافة الكارنتين والاينوستول إلى مخفف Tris في النسبة المئوية لسلامة الاكروسوم لدى نطف ثيران الهولشتاين لمدد زمنية مختلفة من الحفظ بالتبريد والتجميد (المتوسط ± الخطأ القياسي)

المدة	معاملة السيطرة	الكارنتين	الاينوستول
تبريد عند درجة حرارة 5°	^{b}0.57±86.00	^{a}0.54±89.03	^{a}1.38±90.50
بعد 48 ساعة من الحفظ بالتجميد	^{b}0.77±81.50	^{a}0.57±85.00	^{a}1.1±85.30
شهر واحد من الحفظ بالتجميد	^{b}0.69±76.85	^{a}0.75±82.50	^{a}1.21±80.88
بعد شهرين من الحفظ بالتجميد	^{b}0.49±72.07	^{a}0.98±77.03	^{a}0.48±76.56
بعد 3 اشهر من الحفظ بالتجميد	^{b}0.7±66.89	^{a}0.8±72.63	^{a}0.53±72.03

***المتوسطات التي تحمل حروفا مختلفة ضمن الصف الواحد تختلف معنويا ($P\leq0.05$) .**



شكل(4) تأثير المدد الزمنية المختلفة من الحفظ بالتبريد والتجميد في النسبة المئوية لسلامة الاكروسوم لنطف ثيران الهولشتاين بعد إضافة الكارنتين والاينوستول إلى مخفف Tris

*الأحرف المختلفة ضمن المعاملة الواحدة تختلف معنويا (P≤ 0.05).

المصادر

1. Bucak, M. N.; Tuncer, P. B.; Sarıozkan, S.; Bas, N.; Tas, M.; Coyan, K.; Bilgili, A.; Akalın, P. P.; Buyukleblebici, S.; Aydos, S.; Ilgaz, S.; Sungurog, A. & Oztuna, D. (2010 a). Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. Cryobiology, 61: 248-253.
2. Aitken, R. J.; Clarkson, J. S. & Fishel, S. (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. Biol. Reprod., 41:183-197.
3. Medeiros, C. M.; Forell, F.; Oliveira, A. T. & Rodrigues, J. L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? Theriogenology, 57:327-344.
4. Vishwanath, R. & Shannon, P. (2000). Storage of bovine semen in liquid and frozen state. Anim. Reprod. Sci., 62:23-53.
5. Bailey, J. L.; Bilodeau, J. F. & Cormier, N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. J. Androl., 21: 1-8.
6. Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reprod. Fertil. Dev., 7: 871-891.
7. Sikka, S. C. (2004). Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. J. Androl., 25:5-18.
8. Sarıözkan, S.; Bucak, M. N.; Tuncer, P. B.; Ulutas, P. A. & Bilgen, A. (2009). The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation, Cryobiology, 58: 134-138.
9. محمد، عمر عادل، شبر، عبد الله محمد حسن، عبد الكريم، طلال أنور وإبراهيم، فارس فيصل. (2014). تأثير إضافة الكلوتامين والمثايونين إلى مخففات السائل المنوي لثيران الهولشتاين في نوعية السائل المنوي بعد التجميد. مجلة العلوم الزراعية العراقية، 45 (3): 252-262.

10. Bucak, M. N.; Sarıozkan, S.; Tuncer, P. B.; Sakin, F.; Atessahin, A.; Kulaksız, R. & Cevik, M. (2010b). The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancryrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities, Small Rumin. Res., 89: 24-30.
11. Ford, W. C. L. & Rees, J. M. (1990). The bioenergetics of mammalian sperm motility. In: Gagnon, C. (Ed.), Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects. CRC Press, Boca Raton, PP. 175-202.
12. Lewin, L. M.; Fournier-Delpech, S.; Weissenberg, R.; Golan, R.; Cooper, T. & Pholpramool, C. (1997). Effects of pivalic acid and sodium pivalate on l-carnitine concentrations in the cauda epididymidis and on male fertility in the hamster. Reprod. Fertil. Dev., 9: 427-432.
13. Cooper, T. G. (1998). Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. J. Reprod. Fertil., 53: 119-136.
14. Reyes-Moreno, C.; Gagnon, A.; Sullivan, R. & Sirard, M. A. (2000). Addition of specific metabolites to bovine epididymal cell culture medium enhances survival and motility of cryopreserved sperm. J. Androl., 2: 876-886.
15. **S**alisbury, G. M.; Van Denmark, N. L. & Lodge, J. R. (1978). Semen evaluation. Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle., 2nd edn. W. H. Freeman & Co., San Francisco. PP. 326-353.
16. Walton, A. (1933). Technique of artificial insemination. mp. Bur. Anim. Genet. 56, Iiius- Edinburgh.
17. Salisbury, G. W.; Beck, G. H.; Elliontti, I. & Willett, E. L. (1943). Rapid methods for estimating the number of spermatozoa bull semen. J. Dairy Sci., 26:69-79.
18. Swanson, E. W. & Beardon, H. J. (1951). An eosin nigrosin stain differentiating live and dead bovine spermatozoa. J. Anim. Sci., 10:981-987.
19. Hancock, J. L. (1951). A staining technique for the study of temperature shock in semen. Nature, 167: 323-324.
20. Hancock, J. L. (1946). Morphology of bull spermatozoa. Nature., 157: 447.
21. SAS. (2010). SAS/STAT User's Guide for Personal Computers. Release 9.1 SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.
22. Duncan, D. (1955). Multiple Ranges and Multiple F-test. Biometrics., 11:1-42.
23. Sarica, S. M.; Corduk, M.; Suicmez, F.; Cedden, M.; Yildirim, Y. & Kilinc, K. (2007). The effects of dietary L-carnitine supplementation on semen traits, reproductive parameters, and testicular histology of Japanese quail breeders. Appl. Poult. Res., 16: 178-186.
24. Neuman, S. L.; Lin, T. L. & Hester, P. Y. (2002). The Effect of dietary carnitine on semen traits of white leghorn roosters. J. Poult Sci., 47907: 495-503.
25. Agarwal, A. & Said, T. M. (2004). Carnitines and male infertility. Reprod. Biomed. Online, 8: 376-384.
26. السعدي، حسين عبد الكريم. (1987). كتاب التناسل الاصطناعي(الجزء الأول). بيت الحكمة – جامعة بغداد – وزارة التعليم العالي والبحث العلمي.
27. Walensky, L. D. & Snyder, S. H. (1995). Inositol 1,4,5 trisphosphate receptors selectively localized to the acrosome of mammalian sperm. J. Cell Biol., 130: 857-869.
28. Ho, H. C.; Granish, K. A. & Suarez, S. S. (2002). Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by calcium ions and not cAMP. Dev. Biol., 250:208-217.

29. Bilodeau, J. F.; Blanchette, S.; Gagnon, C. & Sirard, M. A. (2001). Thiols prevent H2O2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. Theriogenology, 56:275-286.

30. عيدان، ساجدة مهدي، الزيدي، عمر حسين، إبراهيم، فارس فيصل، التميمي، باسمة عبد رجب ولطيف، وفاء يدام. (2015). تأثير إضافة بعض مضادات الأكسدة الأنزيمية وغير الأنزيمية إلى مخفف Tris في قابلية التجميد لدى ثيران الهولشتاين بعد مدد مختلفة من الحفظ بالتجميد. المجلة الطبية البيطرية العراقية، 39 (2): 19-24.

31. Eidan, S. M. (2016). Effect on post-cryopreserved semen characteristics of Holstein bulls of adding combinations of vitamin C and either catalase or reduced glutathione to Tris extender. Anim. Reprod. Sci. (In press).

32. Tuncer, P. B.; Sarıözkan, S.; Bucak, M. N.; Ulutas, P. A.; Akalın, P. P.; Büyükleblebici, S. & Canturk, F. (2011). Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. Theriogenology, 75: 1459-1465.

33. Thomas, C. A.; Garner, D. L.; De-Jarnette, J. M. & Marshall, C. E. (1997). Fluorometric assessment of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. Biol. Reprod., 45:880-887.

34. Saacke, R. G. & White, J. M. (1972). Semen quality tests and their relationship to fertility. Proceedings of the 4thTechnical Conference on Artificial Insemination and Reproduction, N.A.A.B. PP. 22-27.

35. Khlifaouia, M.; Battuta, I.; Bruyasa, J. F.; Chatagnona, G.; Trime`cheb, A. & Tainturiera, D. (2005). Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. Theriogenology, 63: 138-149.

36. Bucak, M. N.; Atessahin, A. & Yuce, A. (2008). Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. Small Rumin. Res., 75: 128-134.

37. Bansal, A. K. & Bilaspuri, G. S. (2011). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. A review. Vet. Med. Int., 2011:1-7.