

التأثير التآزري لبعض مضادات الأكسدة المضافة إلى مخفف Tris في قابلية تجميد السائل المنوي لثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدد مختلفة

طلال أنور عبد الكريم*، خالد حساني سلطان**، محمود سعدي نون**، فارس فيصل إبراهيم***

معزز عبد الخالق حيدر*** وفاء يدام لطيف***

*قسم الإنتاج الحيواني/ كلية الزراعة - جامعة بغداد

**قسم الإنتاج الحيواني/ كلية الزراعة والغابات - جامعة الموصل

***قسم التلقيح الاصطناعي/ دائرة الثروة الحيوانية - وزارة الزراعة

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة بهدف بيان التأثير التآزري لإضافة بعض مضادات الأكسدة إلى مخفف Tris في صفات السائل المنوي لثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدد مختلفة (بعد 48 ساعة وشهر وشهرين من الحفظ بالتجميد). نُفِدت هذه التجربة في قسم التلقيح الاصطناعي التابع لدائرة الثروة الحيوانية/ وزارة الزراعة للمدة من 15 تشرين الثاني/ 2015 ولغاية 30 آذار/ 2016. استخدم في هذه الدراسة خمسة ثيران هولشتاين بأعمار تتراوح بين 1.5 - 2 سنة. جُمِعَ السائل المنوي بواسطة المهبل الاصطناعي بواقع قذفة واحدة/ ثور/ أسبوع ولمدة 6 أسابيع. تم تجميع السائل المنوي للثيران جميعها (Pooled Semen) وتقسيمه بالتساوي على المجموع الخمسة المختلفة باستخدام مخفف Tris. أُضيف إلى مخفف Tris خليط كل من فيتامين C والكارنتين بتركيز 5 و 7.5 مليمول/ مل على التوالي في المجموعة الثانية (A2)، فيتامين E و Coenzyme Q10 بتركيز 0.2 و 0.5 مليمول/ مل على التوالي إلى المجموعة الثالثة (A3)، فيتامين E و α -lipoic acid بتركيز 0.2 و 0.5 مليمول/ مل على التوالي إلى المجموعة الرابعة (A4)، بينما أُضيف الكارنتين والكانتليز بتركيز 7.5 مليمول و 100 وحدة دولية/ مل على التوالي إلى المجموعة الخامسة (A5)، وتمت مقارنتها مع المجموعة الأولى (A1) التي أُضيف لها مخفف Tris فقط. أظهرت المجموعة A5 تفوقاً معنوياً واضحاً ($P \leq 0.01$) في النسبة المئوية لقابلية تجميد النطف (90.00 ± 5.16 %) مقارنةً بالمجاميع A1، A2 و A4، في الوقت الذي لم تختلف فيه معنوياً مع المجموعة A3 (71.66 ± 6.54 %) بعد مرور 48 ساعة من الحفظ بالتجميد. من جانب آخر، لم تختلف المجاميع A1، A2 و A4 فيما بينها معنوياً في هذه النسبة. لم تختلف النسبة المئوية لقابلية تجميد النطف بين مدد الحفظ المختلفة ضمن المجموعة الواحدة، على الرغم من وجود اتجاهها للانخفاض حسابياً في نسبتها بعد مرور شهر وشهرين مقارنة بمرور 48 ساعة من الحفظ بالتجميد. يمكن الاستنتاج إن التأثير التآزري لإضافة خليط من بعض مضادات الأكسدة قد حسن من قابلية تجميد نطف ثيران الهولشتاين مما سينعكس إيجابياً في زيادة خصوبتها ومن ثم العائد الاقتصادي للمربي.

الكلمات المفتاحية: مضادات الأكسدة، تجميد السائل المنوي، ثيران الهولشتاين.

E-mail: talal200320032000@yahoo.com

The synergistic effect of some antioxidants added to Tris extender on semen freezability of Holstein bulls following different cryopreservation periods

T. A. Abdulkareem*, K. H. Sultan**, M. S. Noon**, F. F. Ibrahim***,
M. A. Haydar*** and W. Y. Latef***

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

**Department of Animal Production/ College of Agriculture and Forestry,
University of Mosul

***Department of Artificial Insemination, Directorate of Animal Resources,
Ministry of Agriculture, Iraq

Abstract

This study was undertaken to investigate the synergistic influence of adding some antioxidants to Tris extender on semen freezability of Holstein bulls following different cryopreservation periods (48 h, 1 and 2 months post cryopreservation, PC). This experiment was executed at the Artificial Insemination Department, belong to the Animal Resources Directorate, Ministry of Agriculture in Abu-Ghraib region (25 Km west of Baghdad) during the period from 15th November 2015 to 30th March 2016. Semen was collected via artificial vagina in one ejaculate per bull per week for the 6-week experimental period. Pooled semen was equally divided into five groups using Tris extender. Combinations of vitamin C + carnitine (5 and 7.5 mm/ ml, respectively; A2), vitamin E + coenzyme Q10 (0.2 and 0.5 mm/ ml, respectively; A3), vitamin E + α -lipoic acid (0.2 and 0.5 mm/ ml, respectively; A4) and carnitine + catalase (7.5 mm and 100 IU / ml, respectively; A5) were added to Tris extender and comparisons in response were made with the control group (Tris extender, A1). Greater ($P \leq 0.01$) semen freezability was noticed in the A5 group ($90.00 \pm 5.16\%$) as compared with the A1, A2 and A4 groups. However, the differences between A5 and A3 ($71.66 \pm 6.54\%$) groups, 46 h PC lacked significance. On the other hand, there were no significant differences among A1, A2 and A4 groups in this character. Moreover, the semen freezability did not significantly differ among the preservation periods within each group, in spite of the numerical decreasing percentages at 1 and 2 months PC as compared with 48 h PC. In conclusion, the synergistic effect of adding some antioxidant combinations had improved semen freezability of Holstein bulls, which will positively reflect in enhancing bull's fertility and owner's economic returns consequently.

Keywords: antioxidants, semen freezability, Holstein bulls

المقدمة

تعد عملية تجميد السائل المنوي للثيران من التقانات الحيوية التي أسهمت في تطوير صناعة أبقار الحليب في العالم عن طريق مساهمتها في حفظ المصادر الوراثية وإنتاج حيوانات متميزة في إنتاجيتها (1). إذ تعد عملية تجميد السائل المنوي من العمليات المعقدة التي تؤدي في أغلب الأحيان إلى إحداث ضرر في خلايا النطفة لدى معظم اللبائن ومنها الثيران (2). وترتبط عملية الحفظ بالتجميد في معظم اللبائن ومنها الثيران بإنتاج أنواع الأوكسجين التفاعلي (Reaction oxygen species, ROS). الذي له دور كبير في أكسدة الدهون (Lipid peroxidation, LPO) لأغشية النطفة، فضلاً عن تحطم المادة الوراثية (DNA damage)، الأمر الذي ينعكس سلباً في انخفاض حركة النطف (Sperm motility) وحيويتها (Viability) وقابليتها على الإخصاب (Fertilizing ability) في الثيران (3، 4، 5). تحتوي نطف الثيران على كميات قليلة من مضادات الأكسدة الداخلية (Endogenous antioxidants) والمصدر الرئيسي لهذه المضادات هي البلازما المنوية (6). يعد

فيتامين C من مضادات الأكسدة غير الأنزيمية (Non-enzymatic antioxidants) الفعالة التي تعمل على إزالة الجذور الحرة (Free radicals scavenger)، كما إن وجوده يساعد على إزالة هذه الجذور ومنها أكسدة الدهون (7). إن إضافة فيتامين C إلى مخففات السائل المنوي تجعل أداء نطف الثيران مثالياً (8)، من خلال تحسين حيويتها وحركتها الفردية وقابليتها للتجميد وخفض نسب النطف الميتة والمشوهة (9، 10، 11، 12). من ناحية أخرى، يعد فيتامين E المكون الأساس لنظام مضادات الأكسدة غير الأنزيمية في النطفة (13)، فضلاً عن كونه أحد وسائل الحماية الرئيسية للنطف من أنواع الأوكسجين التفاعلي وأكسدة الدهون (14)، إذ بإمكانه تثبيط أكسدة الدهون من خلال إزالة جذر البيروكسيل (Peroxy) والكوكسيل (Alkoxy) المشتقة من الدهون لأغشية النطفة (15). وكان لإضافة فيتامين E إلى مخفف Tris دوراً في زيادة العدد الكلي للنطف ذات الأكرسوم السليم والنسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي عند كافة مدد الحفظ المختلفة، في الوقت الذي قللت فيه من النسبة المئوية للتشوهات الكلية للنطف لثيران الهولشتاين (11). من جانب آخر، يعد الكارنتين (L-Carnitine) بمثابة توليفة حيوية من حامضين أمينيين رئيسيين وهما اللايسين (lysine) والميثيونين (methionine) ويتكون في الكبد (liver) و الكلى (kidney) والدماغ (brain) وهو مركب شبيهه بالفيتامين يتواجد أيضاً بتراكيز كبيرة في بريح ونطف الثدييات (16) ويؤدي دوراً في توليد طاقة التمثيل الغذائي، من خلال تسهيل نقل الأحماض الدهنية إلى المايوتوكونديريا (16)، وبالتالي تحصل خلايا البربخ والنطف على الطاقة بمساعدة الكارنتين المتواجد في السائل البريخي (Epididymal fluid) (17، 18). وقد استخدم الكارنتين في مخففات النطف لغرض تحسين صفات السائل المنوي كما في ثيران Simmental (16، 19) وذكر الماعز (16). كما يعد إنزيم الكاتليز (Catalase) أحد الأنظمة الأنزيمية الدفاعية الموجودة في سايتوبلازم النطفة والبلازما المنوية والذي يؤدي دوراً كبيراً في حماية النطف من ضرر أنواع الأوكسجين التفاعلي، إذ يعمل على إزالة أو تقليل تراكيز بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) وتحويله إلى أوكسجين وماء (20، 21). وقد لوحظ إن إضافة تراكيز مختلفة من إنزيم الكاتليز إلى مخفف السترات أدت إلى انخفاض تركيز المألون داي الديهايد (Malondialdehyde) في البلازما المنوية وزيادة حيوية النطف لدى ثيران الجاموس (22). أدت إضافة إنزيم الكاتليز إلى مخفف Tris في تحسين صفات السائل المنوي المجمد وانخفاض نسبة التشوهات طيلة مدد الخزن (11). يشكل إنزيم Co-enzyme Q10 (CoQ10) أو ما يسمى Ubiquinone الجزء الذي تذوب فيه الدهون وهو من مضادات الأكسدة الطبيعية غير الأنزيمية، الذي يعمل على تعزيز الطاقة واستقرار وتنظيم غشاء المايوتوكونديريا (23). كما يعمل على إرواء الجذور الحرة المعرضة للإجهاد وبالتالي منع تأكسد الدهون والبروتين (24). كان لإضافة 0.2 مليمول من CoQ10 إلى مخفف Tris دوراً في تحسين بعض صفات السائل المنوي بعد الحفظ بالتجميد ولمدد مختلفة لدى ثيران الهولشتاين (25). من جانب آخر، يعد حامض الفا ليبويك (α -lipoic acid) من مركبات dithiol التي تتواجد طبيعياً والتي تصنع في المايوتوكونديريا من حامض الاوكتانويك (Octanoic acid)، وهو من العوامل المساعدة لإنزيمات Pyruvate dehydrogenase و Alpha-ketoglutarate dehydrogenase، وبالتالي يلعب دوراً حاسماً في استقلاب الطاقة في المايوتوكونديريا (26، 27)، فضلاً عن قدرته في تجديد غيره من مضادات الأكسدة مثل فيتامين C (28) و فيتامين E (29). وقد أشار (25) إلى دور حامض الفا ليبويك (0.5 مليمول) في تحسن صفات السائل المنوي وانخفاض نسبة التشوهات بصورة ملحوظة لدى ثيران الهولشتاين عند إضافته لمخفف Tris أو عند توليفته مع CoQ10. وقد جرت محاولات عديدة لإضافة أنواع عديدة من مضادات الأكسدة إلى مخفف Tris وتأثيراتها على نوعية السائل المنوي بعد الحفظ بالتجميد لدى ثيران الهولشتاين في العراق (12، 30، 31)، إلا إن نتائج التأثير التآزري لهذه المضادات مع بعضها البعض على قابلية تجميد النطف بعد الحفظ بالتجميد لدى ثيران الهولشتاين لم

يتم التطرق إليها سابقاً سواءً على مستوى العراق أو العالم. لذا فقد أجريت هذه الدراسة لمعرفة تأثير إضافة خليط من بعض مضادات إلى مخفف Tris في قابلية تجميد نطف ثيران الهولشتاين بعد مدد مختلفة من الحفظ بالتجميد.

المواد وطرائق العمل

- **حيوانات التجربة:** أستخدم في هذه التجربة 5 ثيران هولشتاين مدربة على جمع السائل المنوي بطريقة المهبل الاصطناعي، تتراوح أعمارها بين 1.5 - 2 سنة ووزن جسم 450 ± 650 كغم/ ثور. تم أخذ 1 مل من كل قذفة لعمل تجميع للسائل المنوي (Pooled Semen) للتخلص من الفروق الفردية بين الثيران. كانت جميع الثيران بصحة جيدة وخالية من الأمراض وخاضعة للإشراف البيطري. وخضعت جميع الحيوانات لنظام غذائي موحد بعليقة مركزة بمقدار 5 كغم علف مركز/ حيوان وبنسبة بروتين خام 18% وطاقة 3323 كيلو سعرة/ كغم فضلاً عن دريس الجت بكمية تتراوح بين 7-9 كغم/ حيوان/ يومياً والعلف الأخضر بواقع 40 كغم/ حيوان/ يومياً. كما استعمل الماء الصالح للشرب طيلة مدة التجربة.

- **جمع السائل المنوي والمعاملات:** تم جمع السائل المنوي الطازج وإجراء الفحوصات اللازمة لتقييمه (حجم الأس الهيدروجيني PH وتركيز النطف في القذفة، والحركة الجماعية والحركة الفردية) ومن ثم تجميعه (Pooled Semen) في أنبوبة اختبار موضوعة في حمام مائي بدرجة حرارة 37°م، ثم قُسم بالتساوي على المجموعات المختلفة باستخدام مخفف Tris المعد سابقاً. ضمت المجموعة الأولى (A1) مخفف الترس وعدت مجموعة السيطرة. في حين أضيف فيتامين C مع الكارنتين (L- Carnitie) للمجموعة الثانية (A2) (5 مليمول/ مل، SCR, China) و (7.5 مليمول/ مل، Natrol LLC, USA) على التوالي إلى مخفف Tris. أما المجموعة الثالثة (A3) فقد أضيف فيتامين E مع Coenzyme Q10 (0.2 مليمول/ مل، Sigma-Aldrich, USA) و (0.5 مليمول/ مل، Sigma-Aldrich, USA) على التوالي إلى مخفف Tris. كما أضيف في المجموعة الرابعة (A4) فيتامين E مع α -Lipoc Acid (0.2 مليمول/ مل) و (0.5 مليمول/ مل، Sigma-Aldrich, USA) على التوالي إلى مخفف Tris. بينما أضيف في المجموعة الخامسة (A5) إنزيم الكاتليز مع الكارنتين (7.5 مليمول/ مل) و (100 وحدة دولية/ مل، Sigma-Aldrich, USA) على التوالي إلى مخفف Tris. أجريت فحوصات السائل المنوي لكل مجموعة بعد 48 ساعة والشهر الأول والثاني من الحفظ بالتجميد والتي سيتم التطرق لها لاحقاً بشي من التفصيل. وقد حُضر مخفف Tris حسب طريقة (32) وقدرت قابلية التجميد وفقاً لطريقة (33) للوقوف على صفة من صفات السائل المنوي بعد الحفظ بالتجميد وهي قابليتها على المحافظة على خصائصه الفسلجية وحُسبت كما في المعادلة الآتية:

$$\text{قابلية التجميد (\%)} = \frac{\text{نسبة الحركة الفردية للسائل المجمد بعد الإسالة}}{\text{نسبة الحركة الفردية للسائل الطازج}} \times 100$$

- **التحليل الإحصائي:** أجري التحليل الإحصائي للنتائج باستخدام البرنامج الإحصائي SAS (34) لدراسة التأثير التآزري لإضافة أنواع مختلفة من مضادات الأكسدة إلى مخفف Tris في صفات السائل المنوي لثيران الهولشتاين لمدد زمنية مختلفة وفق تصميم عشوائي كامل (CRD) باستعمال تجربة عاملية (5 × 4) وفق الإنموذجين الرياضييين الآتيين:

الإنموذج الرياضي الأول:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

إذ إن:

Y_{ij} = قيمة المشاهدة العائدة للمجموعة (i) = قابلية تجميد النطف.

μ = المتوسط العام للصفة المدروسة.

T_i = تأثير المعاملة (A1: مجموعة السيطرة، A2: فيتامين C + كارنتين، A3: فيتامين E + CoQ10

A4: فيتامين E + α -lipoic acid، A5: كارنتين + كاتليز).

e_{ij} = الخطأ العشوائي الذي يتوزع طبيعياً بمتوسط يساوي صفر وتباين قدره e^2 .

الإنموذج الرياضي الثاني:

$$Y_{ij} = \mu + P_i + e_{ij}$$

إذ إن:

Y_{ij} = (قيمة المشاهدة العائدة للمجموعة (i) = قابلية تجميد النطف.

μ = المتوسط العام للصفة المدروسة.

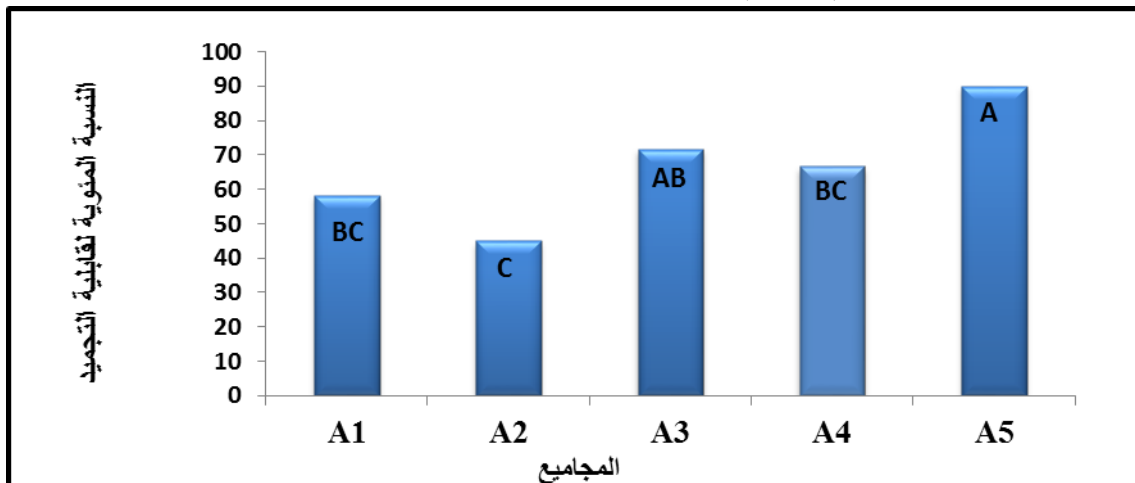
P_i = تأثير مدة الحفظ (48 ساعة وشهر وشهرين من الحفظ بالتجميد).

e_{ij} = الخطأ العشوائي الذي يتوزع طبيعياً بمتوسط يساوي صفر وتباين قدره e^2 .

قورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باستعمال اختبار دنكن متعدد الحدود (35).

النتائج والمناقشة

أظهرت المجموعة A5 تفوقاً معنوياً واضحاً ($P \leq 0.01$) في النسبة المئوية لقابلية تجميد النطف ($90.00 \pm 5.16\%$) مقارنةً بالمجاميع A1، A2 و A4، في الوقت الذي لم تختلف فيه معنوياً مع المجموعة A3 ($71.66 \pm 6.54\%$) بعد مرور 48 ساعة من الحفظ بالتجميد (شكل 1). من جانب آخر، لم تختلف المجاميع A1، A2 و A4 فيما بينها معنوياً في هذه النسبة، على الرغم من تفوق المجموعة A4 ($66.66 \pm 8.43\%$) حسابياً على المجموعتين الباقيتين ضمن المدة نفسها (جدول 1). وضمن السياق نفسه، تفوقت المجموعة A5 ($88.33 \pm 6.00\%$) معنوياً ($P \leq 0.01$) على المجاميع الأخرى والتي لم تختلف فيما بينها معنوياً بعد مرور شهر وشهرين من الحفظ بالتجميد (شكل 2 و 3). لم تختلف النسبة المئوية لقابلية تجميد النطف بين مدد الحفظ المختلفة ضمن المجموعة الواحدة، على الرغم من وجود اتجاهها للانخفاض حسابياً في نسبها بعد مرور شهر وشهرين مقارنة بمرور 48 ساعة من الحفظ بالتجميد (جدول 1).



شكل (1) التأثير التازري لأضافة خليط من مضادات الأكسدة الى مخفف Tris في قابلية تجميد السائل المنوي

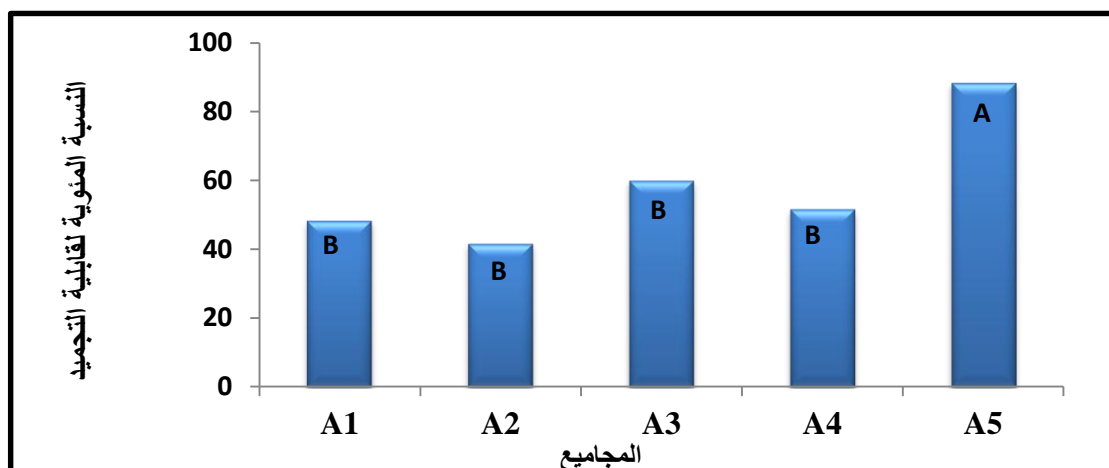
بعد مرور 48 ساعة من الحفظ بالتجميد لدى ثيران الهولشتاين

المتوسطات التي تحمل حرفاً مختلفاً تشير إلى وجود فروق معنوية ($P \leq 0.01$).

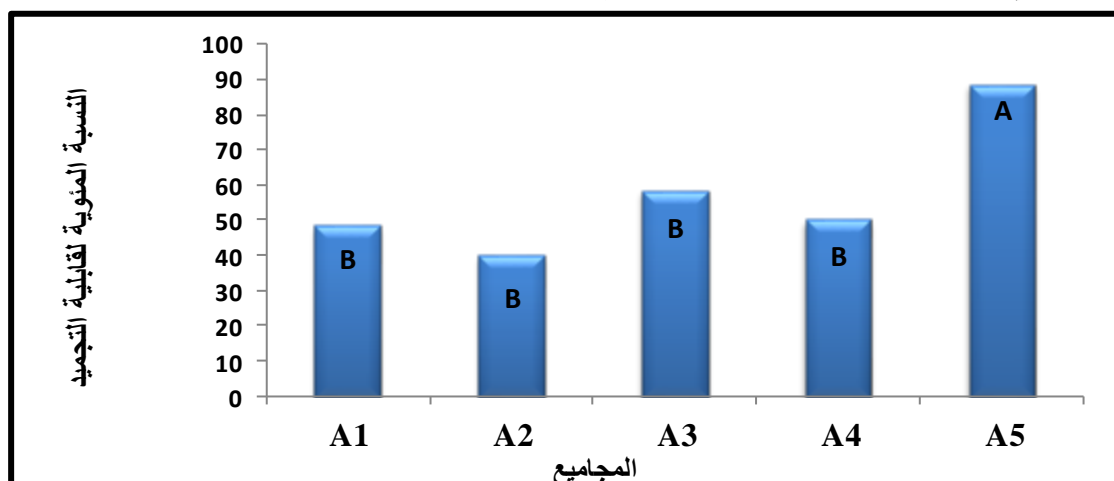
جدول (1) التأثير التآزري لإضافة خليط من بعض مضادات الأكسدة إلى مخفف Tris في قابلية التجميد (%) لنطف ثيران الهولشتاين بعد مدد مختلفة من الحفظ (المتوسط \pm الخطأ القياسي).

مستوى المعنوية	بعد شهرين من الحفظ بالتجميد	بعد شهر واحد من الحفظ بالتجميد	بعد 48 ساعة من الحفظ بالتجميد	المدة / المجموعة
NS	7.03 \pm 48.33 B a	7.03 \pm 48.33 B a	9.09 \pm 58.33 BC a	A1
NS	7.30 \pm 40.00 B a	8.33 \pm 41.66 B a	7.63 \pm 45.00 C a	A2
NS	11.08 \pm 58.33 B a	10.00 \pm 60.00 B a	6.54 \pm 71.66 AB a	A3
NS	8.56 \pm 50.00 B a	8.33 \pm 51.66 B a	8.43 \pm 66.66 BC a	A4
NS	6.00 \pm 88.33 A a	6.00 \pm 88.33 A a	5.16 \pm 90.00 A a	A5
-	P \leq 0.01	P \leq 0.01	P \leq 0.01	مستوى المعنوية

المتوسطات التي تحمل حروفاً كبيرة تشير للمقارنة بين المجموع، والمتوسطات التي تحمل حروفاً صغيرة تشير للمقارنة بين المدد المختلفة ضمن المجموعة الواحدة. NS = غير معنوية.



شكل (2) التأثير التآزري لأضافة خليط من مضادات الأكسدة الى مخفف Tris في قابلية تجميد السائل المنوي بعد مرور شهر من الحفظ بالتجميد لدى ثيران الهولشتاين (المتوسطات التي تحمل حروفاً مختلفة تشير إلى وجود فروق معنوية (P \leq 0.01)).



شكل (3) التأثير التآزري لأضافة خليط من مضادات الأكسدة الى مخفف Tris في قابلية تجميد السائل المنوي بعد مرور شهرين من الحفظ بالتجميد لدى ثيران الهولشتاين (المتوسطات التي تحمل حروفاً مختلفة تشير إلى وجود فروق معنوية (P \leq 0.01)).

اتفقت نتائجنا في المجموعة A5 مع (11) الذي أشار إلى تحسن قابلية تجميد نطف الهولشتاين بعد إضافة إنزيم الكاتليز بتركيز 100 وحدة دولية إلى مخفف Tris. كما اتفقت نتائجنا في المجموعة A3 مع ما أشار إليه Sultan (25) إلى تحسن قابلية التجميد بعد إضافة 0.5 مليمول من المرافق Q10 إلى مخفف Tris. أن سبب تفوق المجموعة A5 المضاف لها الكاتليز والكارنتين (تأزريا) ربما يعود إلى دور إنزيم الكاتليز كمانع للأكسدة وكونه الخط الدفاعي الأول في الخلايا ضد أنواع الأوكسجين التفاعلي والجذور الحرة (36)، إذ إن جزئية واحدة من إنزيم الكاتليز لها القدرة على تفكيك 2 مليون جزئية من H_2O_2 في الدقيقة الواحدة بالإضافة إلى دوره في الحد من نشاط إنزيم NADPH Oxidase مما يقلل من إنتاج جذر O_2^- (37، 38، 39، 40). من ناحية أخرى، وجد إن فعالية إنزيم الكاتليز تعتمد على فعالية مركب NADPH في الغشاء البلازمي للنطفة إذ يرتبط هذا الإنزيم لحماية نفسه من حدوث عدم الفعالية (Inactivation) ومن ثم زيادة فعاليته داخل خلية النطف (21). إن التحسن المعنوي لبعض الصفات في المجموعة المضاف إليها Q10 مع فيتامين E يعود إلى الدور الأساسي لـ CoQ10 في إنتاج ATP، حيث يرتبط وجود ATP بتوافر وجود المرافق Q10 في خلية الحيوان المنوي (41) وهو التفسير المحتمل لمشاركة Q10 في تنظيم إنتاج الطاقة، كما يتركز داخل midpiece الميتوكوندريا (42). وعلاوة على ذلك، المرافق Q10 هو عنصر الأكسدة، والبروتون translocating لا يتجزأ من السلسلة التنفسية الميتوكوندريا (41). وقد يعود ذلك إلى قدرة المرافق Q10 المضادة للأكسدة التي تعمل على إخماد الجذور الحرة، وبالتالي منع الدهون والبروتين بيروكسيد (24، 43). وعلاوة على ذلك، المرافق الأنزيمي Q10 قادرة على الحد ألفا tocopheroxyl جذري لألفا توكوفيرول، وبالتالي التقليل من الأكسدة ودعم فيتامين E، وتقديم أفضل أداء لمضادات الأكسدة في بيئة الحيوانات المنوية (24، 44، 45). لم تتفق نتائجنا في المجموعة A2 مع نتائج الزيدي (11) إذ لاحظ تحسن قابلية التجميد % للنطف بعد إضافة فيتامين C بتركيز 5 مليمول/مول إلى مخفف Tris، كذلك عند إضافة توليفة من فيتامين C مع فيتامين E بتركيز 5، 0.2 مليمول/مول على التوالي إلى مخفف Tris، وذلك بتفوق جميع المعاملات معنويا ($P < 0.01$) على معاملة السيطرة. وهذا ما لم نشاهده في نتائجنا التي أشارت إلى انخفاض المجموعة (A2) الحاوية على فيتامين C والكارنتين معنويا ($P \leq 0.01$) بعد 48 ساعة وحسابيا بعد الشهر الأول والثاني من الحفظ بالتجميد بالمقارنة مع المجاميع الأخرى ومن ضمنها مجموعة السيطرة (A1). مما يدل على عدم نجاح هذه التوليفة المضافة إلى مخفف Tris، وإن إضافة الكاتليز مع الكارنتين (A5) هي التوليفة الأنجح في تحسن قابلية التجميد % والحفاظ على خصائص نطف الهولشتاين.

المصادر

1. Bucak, M. N.; Tuncer, P. B.; Sariözkan, S.; Bas, N.; Tas, M.; Cayan, K.; Bilgili, A.; Akalin, 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. Amirat-Briand, L.; Bencharif, D.; Vera-Munoz, O.; Bel Hadj Ali, H.; Destrumelle, S.; Desherces, S.; Schmidt, E.; Anton, M. & Tainturier, D. (2009). Effect of glutamine on post-thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low density lipoproteins) extender: Preliminary results. *Theriogenology*, 71: 1209-1214.
3. Chatterjee, S.; De Lamirande, E. & Gagnon, C. (2001). Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Mol. Reprod. Dev.*, 60: 498-506.
4. Sariözkan, 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.
5. Crespilho, A. M.; Nichi, M.; Guasti, P. I. V.; Freitas-Dell'Aqua, C. P.; Safilho, M. F.; Mazlero, R. R.; Dell' aqua, J. A. & Papa, F. O. (2014). Sperm fertility and viability following 48h of refrigeration: Evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. *Anim. Reprod. Sci.*, 146: 126-133.

6. Bilodeau, J. F.; Chatterjee, S.; Sirad, M. A. & Gagnon, C. (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol. Reprod.*, 55:282-288.
7. Knight, J. A.; Blaylock, R. C. & Searles, D. A. (1993). The effect of vitamins C and E on lipid peroxidation in stored erythrocytes. *Ann. Clin. Lab.Sci.*, 23: 51-56.
8. Hu, J. H.; Tlan, W. Q.; Zhao, X. L.; Zan, L. S.; Wang, H.; Li, Q. W. & Xin, Y. P. (2010). The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. *Anim. Reprod. Sci.*, 121: 72-77.
9. Beconi, M. T.; Francia, C. R. & Mora, N. G. (1993). Effect of natural antioxidants in frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*, 40: 841-851.
10. Asadpour, R. J. & Nasrabadi, H. T. (2011). Influence of added vitamin C and vitamin E on frozen-thawed bovine sperm cryopreserved in citrate and Tris-based extenders. *Vet. Res. Forum*, 2:37-44.
11. الزبيدي، عمر حسين عباس. (2014). إضافة بعض مضادات الأكسدة و الاميكا 3 إلى مخفف Tris وأثرها في تحسين صفات السائل المنوي بعد الحفظ بالتجميد لثيران الهولشتاين. رسالة ماجستير، كلية الزراعة- جامعة بغداد.
12. 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.*, 167: 1-7.
13. Surai, P. F.; Kostjuk, I. & Wishart, G. (1998). Effect of vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes, and liver. *Biol. Trace Elem. Res.*, 64:119-132.
14. Akiyama, M. (1990). In vivo scavenging effect of ethylcysteine on reactive oxygen species in human semen. *Nippon. Hinyokika. Gakkai Zasshi*, 90:421- 428.
15. Silva, P. F. N. (2006). Physiology of peroxidation processes in mammalian sperm. PhD Thesis, College of Veterinary Medicine. University of Utrecht, Portuguese. PP.35-36.
16. Bucak, M. N.; Sariozkan, S.; Tuncer, P. B.; Sakin, F.; Atessahin, A.; Kulaksız, R. & Cevik, M. (2010 b). The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities, *Small Rumin. Res.*, 89: 24-30.
17. 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.
18. 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.
19. الناصري، عمر عادل محمد. (2013). إضافة بعض الأحماض الأمينية وتوليقاتها إلى مخفف Tris وأثرها في تحسين بعض صفات السائل المنوي المجمد لثيران الهولشتاين في العراق. رسالة ماجستير، كلية الزراعة- جامعة بغداد.
20. Aitken, R. J.; Clarkson, J. S. & Fishel, S. (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol. Reprod.*, 141:183-197.
21. Sicherle, C. C.; Maiab, M. S.; Bicudo, S. D.; Rodella, L. & Azevedo, H. C. (2011). Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen – thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. *Small Rumin. Res.*, 95: 144-149.
22. Asadpour, R.; Jafari, R. & Tayefi-Nasrabadi, H. (2012). The effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and lipid peroxidation of chilled bull spermatozoa. *Iranian J. Vet. Res.*, 13: 246-249.
23. Turunen, M.; Olsson, J. & Dallner, G. (2004). Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1660:171-199.
24. Gürkan, A. S. & Bozda-Dündar, O. (2005). Coenzyme Q10. *J. Fac. Pharm. Ankara*, 34:129-154.
25. Sultan, O. A. A. (2015). Effect of adding co-enzymes (α -lipoic acid and Q10) and manganese on post-cryopreservation semen quality characteristics of Holstein bulls. Master Thesis, College of Agriculture, University of Baghdad.

26. Long, J.; Gao, F. & Tong, L. (2009). Mitochondrial decay in the brains of old rats: ameliorating effect of alpha-lipoic acid and acetyl-L-carnitine. *Neurochem. Res.*, 34: 755-763.
27. Shay, K. P.; Moreau, R. F.; Eric, J.; Smith, E. J.; Smith, A. R. & Hagen, T. M. (2009). Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanism and therapeutic potential. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1790: 1149-1160.
28. Ibrahim, S. F.; Osman, K.; Othman, A. M.; Majid, N. A. & Rahman, M. P. (2008). A study of the antioxidant effect of alpha lipoic acids on sperm quality. *Clinics (Sao Paulo)*, 63: 545-550.
29. Packer, L.; Kraemer, K. & Rimbach, G. J. (2001). Molecular aspects of lipid acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*, 17: 888-895.
30. عيدان، ساجدة مهدي؛ الزيدي، عمر حسين عباس؛ إبراهيم، فارس فيصل؛ التميمي، باسمة عبد رجب ولطيف، وفاء يدام. (2015). تأثير إضافة بعض مضادات الأكسدة الانزيمية وغير الانزيمية إلى مخفف Tris في قابلية التجميد لثيران الهولشتاين بعد مدد مختلفة من الحفظ بالتجميد. *المجلة الطبية البيطرية العراقية*، 39 (2): 19-24.
31. عبد الكريم، طلال أنور؛ محمد، عمر عادل؛ شبر، عبد الله محمد حسن؛ إبراهيم، فارس فيصل ولطيف، وفاء يدام. (2016). تأثير إضافة الكارنتين والايونستول إلى مخفف Tris في نوعية السائل المنوي بعد التجميد لثيران الهولشتاين. *مجلة الأنبار للعلوم البيطرية*، 9: 8-18.
32. Salamon, S. & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 77-111.
33. Patt, J. A. & Nath, J. (1969). Effect of diluents equilibration time and Freezing rates on storage of ram semen. *Cryobiology*, 5: 385-392.
34. SAS. (2010). *SAS/STAT User's Guide for Personal Computers*. Release 9.1 SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.
35. Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F. Tests. *Biometrics*. 11: 1-42.
36. Caballero, B. M. D. (2007). *Antioxidant Nutrients*. PhD Thesis. Johns Hopkins University.
37. Auclair, C.; Cramer, E.; Hakim, J. & Boivin, P. (1976). Studies on the mechanism of NADPH oxidation by the granula fraction isolated from human resting polymorphonuclear blood cells. *Biochem.*, 58: 1359-1366.
38. Martin, D. W.; Mayes, P. A. & Rodweel, V. W. (1983). *Harper's Review of biochemistry*. 18th ed., Lang medical publications. Lebanon. P. 128.
39. Wozniak, A. (2004). Activity of antioxidant enzymes and concentration of lipid peroxidation products in tissues of both health and melanoma bearing. *Z. Gerontol. Geriatr.*, 37:184-189.
40. Agarwal, A.; Gupta, S. & Sharma, R. K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod. Biol. Endocrin.*, 3: 28 -38.
41. Lewin, A. & Lavon, H. (1997). The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function. *Mol. Biotech.*, 18:213-219.
42. Begum, H.; Moniruddin, A. & Nahar, K. (2009). Environmental and nutritional aspects in male fertility. *J. Med.*, 10:16-19.
43. Gualtieri, R.; Barbato, V.; Fiorentino, I.; Braun, S.; Rizos, D.; Longobardi, S. & Talevi, R. (2014). Treatment with zinc, d-aspartate, and coenzyme Q10 protects bull sperm against damage and improves their ability to support embryo development. *Theriogenology*, 82: 592-598.
44. Thomas, S. R.; Neuzil, J. & Stocker, R. (1996). Co supplementation with coenzyme Q prevents the pro-oxidant effects of alpha tocopherol and increase the resistance of LDL to transition metal-dependent oxidation initiation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 16: 687-696.
45. Thomas, S. R.; Neuzil, J. & Stocker, R. (1997). Inhibition of LDL oxidation by ubiquinol-10. A protective mechanism for coenzyme Q in atherogenesis? *Mol Aspects Med*, 18 (Suppl.): 85-103.