التأثير التآزري لبعض مضادات الأكسدة المضافة إلى مخفف Tris في النسبة المئوية لحركة النطف الفردية لدى ثيران الهولشتاين بعد مدد مختلفة من الحفظ بالتبريد والتجميد

طلال أنورعبد الكريم*، محمود سعدي نون[1]** خالد حساني سلطان **

* قسم الإنتاج الحيواني/ كلية الزراعة - جامعة بغداد

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

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 التبريد بدرجة 5°م و48 ساعة وشهر وشهرين من الحفظ بالتجميد). نُفِذَت هذه التجربة في قسم التلقيح الاصطناعي التابع لدائرة الثروة الحيوانية/ وزارة الزراعة في منطقة أبو غريب (25 كم غرب بغداد) 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 بوساطة المهبل الاصطناعي بواقع قذفة واحدة/ ثور/ أسبوع ولمدة 6 أسابيع. تمَّ تجميع السائل المنوي للثيران جميعها (Pooled Semen) وتقسيمه بالتساوي على المجاميع الخمسة المختلفة. أضيف إلى المجموعة الأولى (A1) مخفف Tris فقط حيث عدت مجموعة السيطرة، أضيف إلى مخفف Tris خليط كل من فيتامين C والكارنتين بتركيز 5 و7.5 مليمول/ مل على التوالي في المجموعة الثانية (A2)، وفيتامين E وCoenzyme Q10 بتركيز 0.2 و0.5 مليمول/ مل على التوالي إلى المجموعة الثالثة (A3)، وفيتامين E وα-lipoic acid بتركيز 0.2 و0.5 مليمول/ مل على التوالي إلى المجموعة الرابعة (A4)، بينما أضيف الكارنتين والكاتليز بتركيز 7.5 مليمول و100 وحدة دولية/ مل على التوالي إلى المجموعة الخامسة (A5). أظهرت نتائج الدراسة تفوق المجموعة A5 معنويا ($P\leq 0.01$) على بقية المجاميع قيد الدراسة في الحركة الفردية للنطف بعد شهر واحد وشهرين من الحفظ بالتجميد مسجلةً 44.16 ± 3.00 % وعلى المجاميع A1 وA2 وA4 لهذه الصفة بعد 48 ساعة من الحفظ بالتجميد، في حين انعدمت الفروق المعنوية بين المجاميع المختلفة خلال مدة الحفظ بالتبريد بدرجة حرارة 5°م. كما لم تختلف النسبة المئوية للحركة الفردية للنطف معنوياً بين مدد الحفظ المختلفة لدى المجموعة A5. أما المجموعة A2 فقد سجلت أقل حركة فردية للنطف وذلك بعد 48 ساعة من الحفظ بالتجميد إذ بلغت 22.50 ± 3.81 %. يمكن الاستنتاج إن التأثير التآزري لإضافة بعض مضادات الأكسدة قد حسن من النسبة المئوية لحركة نطف ثيران الهولشتاين الفردية مما سينعكس ايجابياً في زيادة خصوبتها ومن ثم العائد الاقتصادي للمربي.

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

E-mail: talal200320032000@yahoo.com

[1] البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني.

The synergistic Influence of some antioxidants added to Tris extender on sperm cells individual motility of Holstein bulls following different cooling and cryopreservation periods

T. A. Abdulkareem[*], M. S. Noon[**] K. H. Sultan[**]
[*]**Department of Animal Production, College of Agriculture/ University of Baghdad,**
[**]**Department of Animal Production, College of Agriculture and Forestry/ University of Mosul**

Abstract

This study was conducted to explore the synergistic effect of adding some antioxidants to Tris extender on sperm cells individual motility of Holstein bulls following different cooling and cryopreservation periods (5°C, 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. Was added to the first group (A1) diluted Tris just where I went back the control group, 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). The individual motility (IM) was greater ($P \leq 0.01$) in the A5 as compared with the remaining groups at 1 and 2 months PC (44.16 ± 3.00 %). Moreover, the IM was also greater ($P \leq 0.01$) in A5 as compared with the A1, A2 and A4 groups at the 48 h PC time period. However, the IM was not significantly different in all groups at the cooling time period. As the percentage of individual movement of sperm was significantly different between the extended conservation at A5 Group did not differ. The Group A2 has recorded the lowest individual movement of the sperm after 48 hours of conservation freeze-reaching 22.50 ± 3.81%. In conclusion, the synergistic effect of adding some antioxidant combinations had improved sperm cells individual motility of Holstein bulls, which will positively reflect in enhancing bull's fertility and owner's economic returns consequently.

Keywords: antioxidants, semen freezability, individual motility 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 تُعد 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 سلبا 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 ناحيةٍ أُخرى، يعد فيتامين E المكون الأساس لنظام مضادات الأكسدة غير الأنزيمية في النطفة (13)، فضلاً عن كونه أحد وسائل الحماية الرئيسة للنطف من أنواع الأوكسجين التفاعلي وأكسدة الدهون (14)، إذ بإمكانه تثبيط أكسدة الدهون من خلال إزالة جذر البيروكسيل (Peroxyl) والكوكسيل (Alkoxyl) المشتقة من الدهون لأغشية النطفة (15). يعد الكارنتين (L-Carnitine) بمثابة توليفة حيوية من حامضين أمينيين رئيسيين وهما اللايسين (lysine) والمثيونين (methionine) ويتكون في الكبد (liver) والكلى (kidney) والدماغ (brain) وهو مركب شبيه بالفيتامين يتواجد أيضا بتراكيز كبيرة في بربخ ونطف الثدييات (16) ويؤدي دورا في توليد طاقة التمثيل الغذائي، من خلال تسهيل نقل الأحماض الدهنية إلى المايتوكوندريا (16)، وبالتالي تحصل خلايا البربخ والنطف على الطاقة بمساعدة الكارنتين المتواجد في السائل البربخي (Epididymal fluid) (17، 18). وقد استخدم الكارنتين في مخففات النطف لغرض تحسين صفات السائل المنوي كما في ثيران Simmental (16، 19) وذكور 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 المالون 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 الانزيمية، الذي يعمل على تعزيز الطاقة واستقرار وتنظيم غشاء المايتوكوندريا (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 المايتوكوندريا من حامض الاوكتانويك (Octanoic acid)، وهو من العوامل المساعدة لإنزيمات Pyruvate dehydrogenase و Alpha-ketoglutarate dehydrogenase، وبالتالي يلعب دورا حاسما في استقلاب الطاقة في المايتوكوندريا (26، 27)، فضلاً عن قدرته في تجديد غيره من مضادات الأكسدة مثل فيتامين C (28) و فيتامين E (29). وقد أشار Sultan (25) إلى دور حامض الفا ليبويك (0.5 مليمول) في تحسن صفات السائل المنوي 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 و تأثيراتها على نوعية السائل المنوي بعد الحفظ بالتجميد لدى ثيران الهولشتاين في العراق (12، 30، 31، 32)، إلا إن نتائج التأثير التآزري لهذه المضادات مع بعضها البعض على النسبة المئوية لحركة النطف الفردية بعد الحفظ بالتبريد والتجميد 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 النسبة المئوية لحركة نطف ثيران الهولشتاين الفردية بعد مدد مختلفة من الحفظ بالتبريد والتجميد.

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 وبوزن 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 الهيدروجين 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 قُسَم بالتساوي على المجاميع التالية: 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- Lipoic 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. أُجريت فحوصات السائل المنوي لكل مجموعة بعد التبريد بدرجة 5°م و48 ساعة والشهر الأول والثاني من الحفظ بالتجميد. وقد حُضر مخفف Tris حسب طريقة (33) وقدرت الحركة الفردية% وفقا لطريقة (34، 35) وذلك بأخذ قطرة من السائل المنوي وتخفيفها مع 3 قطرات من محلول سترات الصوديوم بتركيز 2.9% وبنسبة تخفيف 1:9 سائل منوي: محلول سترات الصوديوم في أنبوبة إختبار موضوعة في حمام مائي بدرجة حرارة 37°م، ثم وضعت القطرة على شريحة زجاجية دافئة مع وضع غطاء الشريحة (Cover Slid) وفحصها تحت المجهر الضوئي وبقوة تكبير× 400. وحسبت الحركة الفردية للنطف المتحركة حركة تقدمية أمامية، وعدت النطف ذات الحركة الغير طبيعية (دائرية، للخلف، البندولية) غير متحركة إستناداً لما أورده (35).

جدول (1) معايير الحركة الفردية للنطف ونسبتها

الحركة الفردية للنطف		
ت	نوع الحركة	النسبة المئوية
1	جميع النطف متحركة	100 – 90
2	أكثر النطف متحركة	80 – 70
3	نصف النطف متحركة	60 – 50
4	أكثر النطف غير متحركة	40 – 30
5	عدد النطف المتحركة قليل	20 –10
6	لا توجد نطف متحركة	صفر

التحليل الإحصائي: أجري التحليل الإحصائي للنتائج باستخدام البرنامج الإحصائي SAS (36) 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 الرياضيين الآتيين:

الإنموذج الرياضي الأول:

$$Yij= \mu + Ti + eij$$

الإنموذج الرياضي الثاني:

$$Yij = \mu + Pi + eij$$

إذ إن:

Yij = (قيمة المشاهدة العائدة للمجموعة i) = النسبة المئوية للحركة الفردية للنطف.

μ = المتوسط العام للصفة المدروسة.

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

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

Pi = تأثير مدة الحفظ (التبريد بدرجة 5°م و48 ساعة وشهر وشهرين من الحفظ بالتجميد).

eij = الخطأ العشوائي الذي يتوزع طبيعياً بمتوسط يساوي صفر وتباين قدره $e^2\sigma$.

قورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باستعمال اختبار دنكن متعدد الحدود (37).

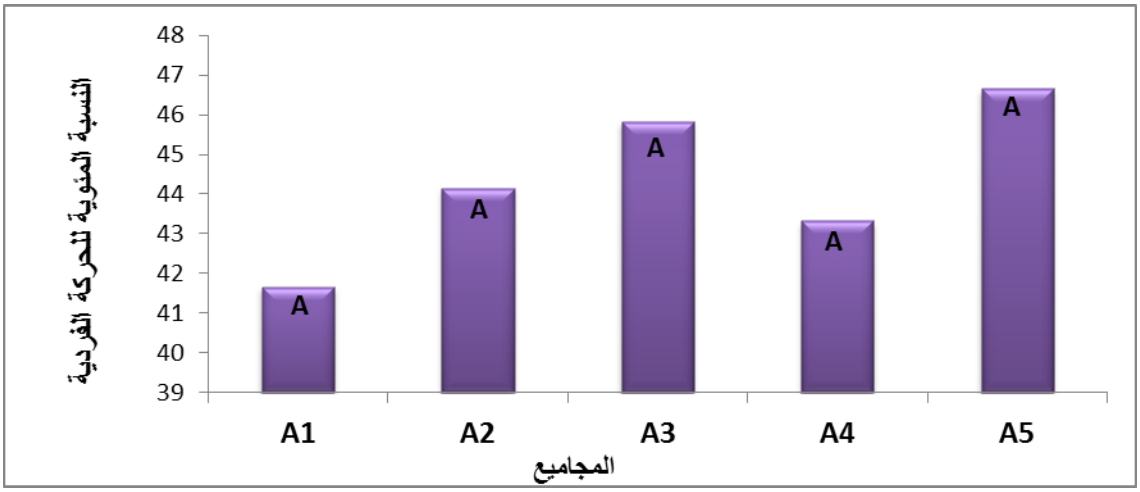
النتائج والمناقشة

انعدمت الفروق المعنوية بين المجاميع المختلفة في الحركة الفردية للنطف خلال مدة الحفظ بالتبريد بدرجة حرارة 5°م، في الوقت الذي تفوقت فيه المجموعة A5 (45.00 ± 2.58 %؛ جدول 2 وشكل 1) معنوياً (P≤ 0.01) على المجاميع A1 وA2 وA4 لهذه الصفة بعد 48 ساعة من الحفظ بالتجميد (شكل 2). من جانب آخر، تفوقت المجموعة A3 (35.83 ± 3.27 %) معنوياً (P≤ 0.01) على المجموعة A2 (22.50 ± 3.81 %) للمدة نفسها، مع انعدام الفروق المعنوية بينها وبين المجموعتين A1 وA4 (جدول 2). ومن الجدير بالذكر فقد سجلت المجموعة A2 أقل حركة فردية للنطف بلغت 22.50 ± 3.81 %. تفوقت المجموعة A5 معنويا (P≤ 0.01) على بقية المجاميع قيد الدراسة في الحركة الفردية للنطف بعد شهر واحد وشهرين من الحفظ بالتجميد (شكل 3 و4)، إذ بلغت 44.16 ± 3.00%، مع انعدام الفروق المعنوية بين بقية المجاميع ولمدتي الحفظ. لم تختلف النسبة المئوية للحركة الفردية للنطف معنوياً بين مدد الحفظ المختلفة لدى المجموعة A5، في الوقت الذي تفوقت فيه مدة الحفظ بالتبريد معنوياً (P≤ 0.01) على بقية المدد لهذه الصفة لدى المجموعتين A1 وA2 وعلى مدتي الحفظ بعد شهر وشهرين لدى المجموعتين A3 وA4 (جدول 2).

جدول (2) التأثير التآزري لإضافة خليط من بعض مضادات الأكسدة إلى مخفف Tris في النسبة المئوية لحركة نطف ثيران الهولشتاين الفردية بعد مدد مختلفة من الحفظ بالتبريد والتجميد (المتوسط ± الخطأ القياسي)

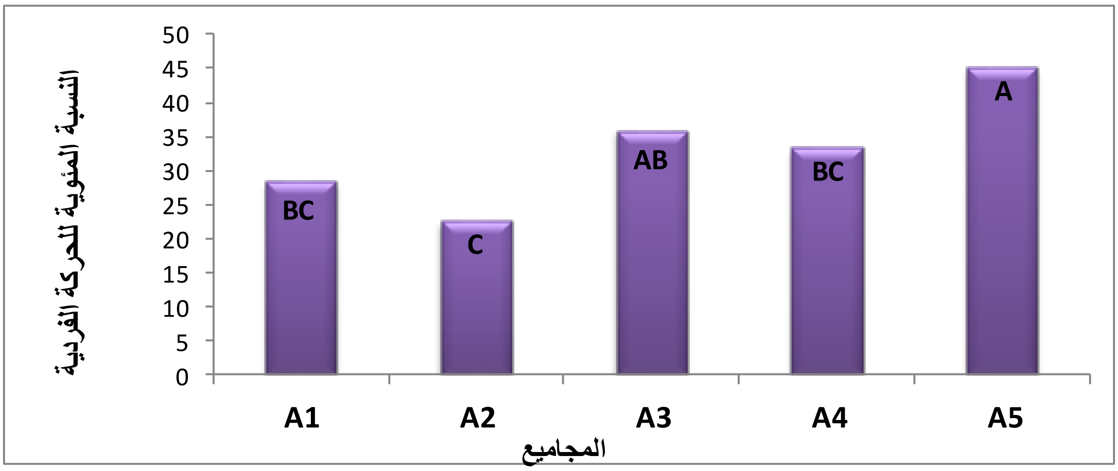
المدة / المجموعة	تبريد عند درجة حرارة 5°م	بعد 48 ساعة من الحفظ بالتجميد	بعد شهر واحد من الحفظ بالتجميد	بعد شهرين من الحفظ بالتجميد	مستوى المعنوية
A1	4.59±41.66 A a	4.01±28.33 BC b	3.51±24.16 B b	3.51±24.16 B b	P≤ 0.01
A2	5.38±44.16 A a	3.81±22.50 C b	4.16±20.83 B b	3.65±20.00 B b	P≤ 0.01
A3	2.00±45.83 A a	3.27±35.83 AB ab	5.00±30.00 B b	4.54±29.16 B b	P≤ 0.01
A4	4.40±43.33 A a	4.21±33.33 BC ab	4.16±25.83 B b	4.28±25.00 B b	P≤ 0.01
A5	2.47±46.66 A a	2.58±45.00 A a	3.00±44.16 A a	3.00±44.16 A a	NS
مستوى المعنوية	NS	P≤ 0.01	P≤ 0.01	P≤ 0.01	-

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



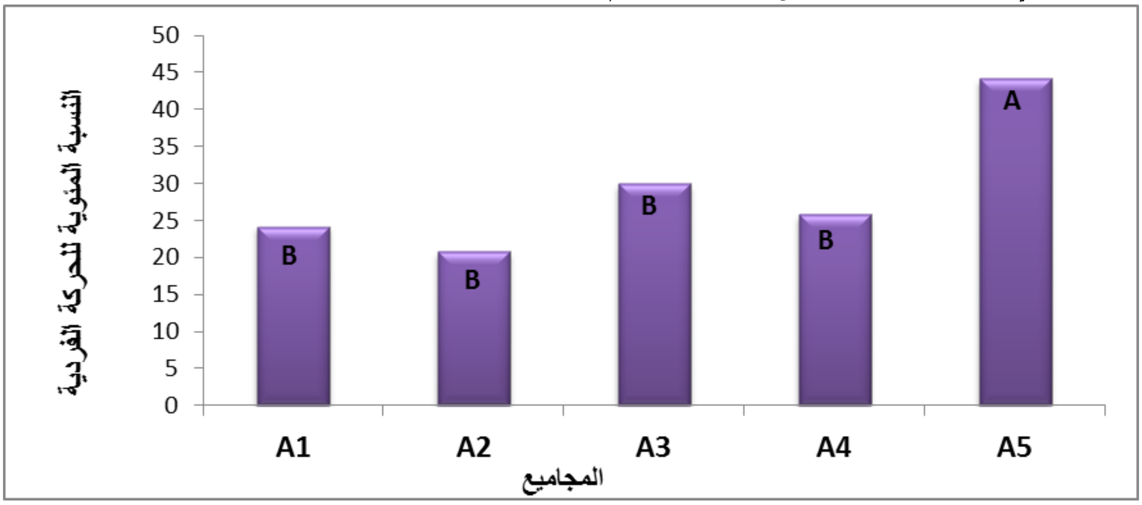
شكل (1) التأثير التازري لأضافة خليط من مضادات الأكسدة الى مخفف Tris في النسبة المئوية لحركة نطف ثيران الهولشتاين الفردية بعد الحفظ بالتبريد بدرجة 5°م.

المتوسطات التي تحمل حروفاً مختلفةً تشير إلى وجود فروق معنوية (P≤ 0.01) بين المجاميع المختلفة.



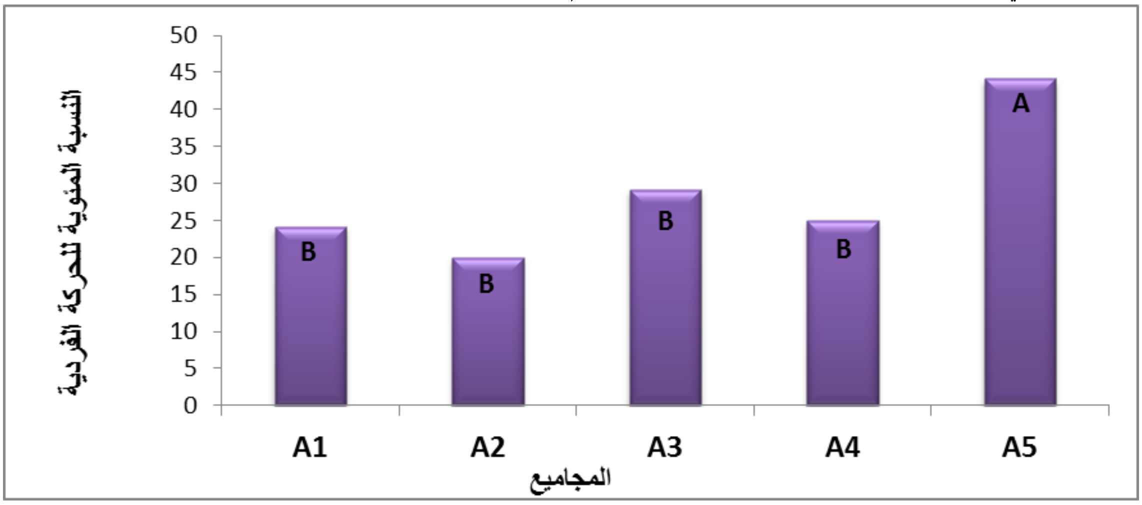
شكل (2) التأثير التآزري لأضافة خليط من مضادات الأكسدة الى مخفف Tris في النسبة المئوية لحركة نطف ثيران الهولشتاين الفردية بعد مرور 48 ساعة من الحفظ بالتجميد.

المتوسطات التي تحمل حروفاً مختلفةً تشير إلى وجود فروق معنوية ($P\leq 0.01$) بين المجاميع المختلفة.



شكل (3) التأثير التآزري لأضافة خليط من مضادات الأكسدة الى مخفف Tris في النسبة المئوية لحركة نطف ثيران الهولشتاين الفردية بعد مرور شهر واحد من الحفظ بالتجميد.

المتوسطات التي تحمل حروفاً مختلفةً تشير إلى وجود فروق معنوية ($P\leq 0.01$) بين المجاميع المختلفة.



شكل (4) التأثير التآزري لأضافة خليط من مضادات الأكسدة الى مخفف Tris في النسبة المئوية لحركة نطف ثيران الهولشتاين الفردية بعد مرور شهرين من الحفظ بالتجميد.

المتوسطات التي تحمل حروفاً مختلفةً تشير إلى وجود فروق معنوية ($P\leq 0.01$) بين المجاميع المختلفة.

اتفقت نتائجنا مع ما وجده (38) الذين لاحظوا زيادةً معنويةً ($P \leq 0.05$) لحركة النطف الفردية بعد إضافة 300 وحدة دولية من إنزيم الكاتليز إلى مخفف Tris ‏(49.75 ± 3.63%) مقارنةً مع مجموعة السيطرة (39.0 ± 2.90%) لدى الكلاب. وفي سياق ذي صلة، أتفقت النتائج الحالية مع ما أورده (39) الذين لاحظوا تحسناً معنوياً للحركة الفردية للثيران بعد الحفظ بالتجميد عند أضافتهم 200 وحدة دولية من إنزيم الكاتليز إلى مخفف Tris مقارنةً مع مجموعة السيطرة (20.8 ± 2.9 % مقابل 11.6± 7.6 %). كما اتفقت نتائجنا مع نتائج (40) في تحسن الحركة الفردية لنطف الثيران بعد إضافة 100 و200 وحدة دولية من إنزيم الكاتليز إلى مخفف Tris. كما جاءت نتائج الدراسة الحالية متفقةً مع ما وجده (19، 31) من زيادةً في النسبة المئوية لحركة النطف الفردية لثيران الهولشتاين بعد مرور ثلاثة أشهر على حفظها بالتجميد نتيجة لإضافة الكارنتين سواء أكان بمفرده (7.5 مليمول/ مل) أو خليطاً مع الاينوسيتول (7.5 مليمول/ مل) إلى مخفف Tris. إن سبب تفوق المجموعة A5 المضاف لها الكاتليز والكارنتين (تآزريا) ربما يعود إلى دور إنزيم الكاتليز كمانع للأكسدة وكونه الخط الدفاعي الأول في الخلايا ضد أنواع الأوكسجين التفاعلي والجذور الحرة (41)، 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 أنزيم NADPH Oxidase مما يقلل من أنتاج جذر O_2^{-} ‏(42، 43، 44، 45). 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 الحسابي لحركة النطف الفردية في المجموعة (A3) المضاف إليها Q10 مع فيتامين E خلال مدد الحفظ المختلفة بالتجميد يعود إلى الدور الأساسي لـ CoQ10 في إنتاج ATP، حيث يرتبط وجود ATP بتوافر وجود المرافق Q10 في خلية الحيوان المنوي (46) وهو التفسير المحتمل لمشاركة Q10 في تنظيم إنتاج الطاقة، كما يتركز داخل midpiece الميتوكوندريا (47). وعلاوة على ذلك، المرافق Q10 هو عنصر الأكسدة، والبروتون translocating لا يتجزأ من السلسلة التنفسية الميتوكوندريا (46). وقد يعود ذلك إلى قدرة المرافق Q10 المضادة للأكسدة التي تعمل على إخماد الجذور الحرة، وبالتالي منع الدهون والبروتين بيروكسيد (24، 47). 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، 49، 50). أن النتائج الحالية اكدت وبشكل كبير نتائج التاثير التازري لإضافة خليط من بعض مضادات الأكسدة المختلفة في زيادة قابلية تجميد نطف ثيران الهولشتاين (32). لم تتفق نتائجنا في المجموعة A2 مع نتائج (11) إذ لاحظ تحسن الحركة الفردية% 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 حسابيا بعد مدد الحفظ بالتجميد المختلفة بالمقارنة مع المجاميع الأخرى ومن ضمنها مجموعة السيطرة (A1). مما يدل على عدم نجاح هذه التوليفة المضافة إلى مخفف Tris، نستنتج من ذلك إن إضافة الكاتليز مع الكارنتين (A5) هي التوليفة الأنجح في تحسن النسبة المئوية لحركة النطف الفردية لثيران الهولشتاين.

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. 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. 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.
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.الزيدي، عمر حسين عباس. (2014). إضافة بعض مضادات الأكسدة و الاوميكا 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.; Sarıozkan, 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 ancryrensis) 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 وتوليفاتها 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 lipoid 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 والاينوستول إلى مخفف Tris في نوعية السائل المنوي بعد التجميد لثيران الهولشتاين. مجلة الأنبار للعلوم البيطرية، 9: 8-18.

32.عبد الكريم، طلال أنور، سلطان، خالد حساني، نون، محمود سعدي، إبراهيم، فارس فيصل، حيدر، معزز عبد الخالق ولطيف، وفاء يدام. (2017). التأثير التآزري لبعض مضادات الأكسدة المضافة إلى مخفف Tris في قابلية تجميد السائل المنوي لثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدد مختلفة. مجلة الأنبار للعلوم البيطري، 10: 1 (قيد النشر).

33.Salamon, S. & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen Anim. Reprod. Sci., 62: 77-111.

34.Walton, A. (1933). Technique of artificial insemination. Mp. Bur. Anim. Genet. Iiius-Edinburgh. p. 56.

35.Chemineau, D.; Cogine, Y.; Guerin; Y.; Orgeure, P. & Valtet, J. C. (1991). Training manual on Artificial insemination in sheep and goat. FAO. Animal Productive and health, 3: 83- 90.

36.SAS. (2010). SAS/STAT User's Guide for Personal Computers. Release 9.1SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.

37.Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F. Tests. Biometrics. 11: 1-42.

38.Michael, A.; Alexopoulos, C.; Pontiki, E.; Hadjipavlou-Litina, D.; Saratsis, P. & Boscos, C. (2007). Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. Theriogenology, 68: 204–212.

39.Fernandez-Santos, M. R.; Dominguez-Rebolledo, A. E.; Esteso, M. C.; Garde, J. J. & Martinez–Pastor, F. (2009). Catalase supplementation on thawed bull spermatozoa abolishes the detrimental effect of oxidative stress on motility and DNA integrity. Int. J. Androl., 32: 353–359.

40.Asadpour, R. J.; Jafari, R. & Nasrabadi, H. T. (2011). Effect of various levels of catalase antioxidant in semen extenders on lipid peroxidation and semen quality after the freeze-thawing bull semen. Vet. Res. Forum, 2 (4): 218 – 221.

41.Caballero, B. M. D. (2007). Antioxidant Nutrients. PhD Thesis. Johns Hopkins University.

42.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.

43.Martin, D. W.; Mayes, P. A. & Rodweel, V. W. (1983). Harper's Review of biochemistry. 18th edn - Lang medical publications. Lebanon. pp: 128.

44.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.

45.Agarwal, A.; Gupta, S. & Sharma, R. K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. Reprod. Biol. Endocrin., 3: 28-38.

46.Lewin, A. & Lavon, H. (1997). The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function. Mol. Biotech., 18:213−219.

47.Begum, H.; Moniruddin, A. & Nahar, K. (2009). Environmental and nutritional aspects in male fertility. J. Med., 10:16-19.

48.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.

49.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.

50.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.