تأثير إضافة تراكيز مختلفة من الكلوتاثيون المختزل الى مخفف السائل المنوي المحفوظ عند درجة 5مْ ومدة الحفظ بالتبريد في نسبة الحركة الفردية والنطف المشوهة للكباش العواسي

حسام جاسم حسين بنانه* وحاكم تكليف عبد الخزرجي[1]**

*كلية الزراعة/ جامعة بغداد

**مديرية زراعة النجف الأشرف/ وزارة الزراعة

الخلاصة

أجريت الدراسة الحالية خلال المدة من شباط 2017 وحتى آذار 2017، بهدف بيان تأثير اضافة مستويات مختلفة من الكلوتاثيون المختزل (مضاد أكسدة) الى مخفف السائل المنوي للكباش العواسي وتأثيرها في بعض صفات السائل المنوي بعد الحفظ بالتبريد على درجة حرارة 5مْ لمدة خمسة أيام، في الحقل الحيواني والمختبرات التابعة الى قسم الإنتاج الحيواني/ كلية الزراعة/ جامعة بغداد في الجادرية. استخدم في هذه الدراسة أربعة كباش عواسي محلية تراوحت أعمارها بين (2–4) سنوات. تم جمع السائل المنوي بوساطة المهبل الاصطناعي بواقع قذفة واحدة/ كبش/ أسبوع، تم مزج السائل المنوي للكباش (Pooled semen) لإزالة الفروق الفردية بين الكباش وأجريت الفحوص اللازمة لتقييم السائل المنوي الطازج قبل التخفيف من حيث اللون والقوام ودرجة الأس الهيدروجيني pH والحركة الجماعية والحركة الفردية وتركيز النطف ونسبة النطف الحية والمشوهة، وقسمت العينة بالتساوي على معاملات التجربة باستخدام مخفف Tris وبنسبة تخفيف 1 : 10، والتي تألفت من ثلاث معاملات أضيف إليها وهي:T1 : مجموعة السيطرة (مخفف Tris). T2 : مخفف Tris+ كلوتاثيون (30 ملغم/ 100 مل). T3: مخفف Tris+ كلوتاثيون (60 ملغم/ 100 مل). وأشارت النتائج إلى ان إضافة الكلوتاثيون المختزل T3 أدت إلى تفوق عالي المعنوية (P<0.01) في صفات نسبة الحركة الفردية ونسبة النطف المشوهة في زمن الحفظ 96 ساعة، إذ بلغت (57.50±7.77 و25.75±0.67)% على التوالي، مقارنة بمعاملة السيطرة التي بلغت (40.25±5.93 %). أما بالنسبة لتأثير مدة الحفظ على الحركة الفردية، فكان تأثير وقت الحفظ عند الزمن (0 ساعة) غير معنوي، وعالي المعنوية (P< 0.01) عند الزمن (24، 48، 72 و96) ساعة، أما بالنسبة لتأثير وقت الحفظ في نسبة النطف المشوهة، فقد كان تأثيره عالي المعنوية (P < 0.01) على المعاملات في الأوقات جميعها، إذ تزداد نسبة النطف المشوهة (%) بزيادة مدة الحفظ بالتبريد على درجة حرارة 5 مْ ولكن بنسب متفاوتة. وقد أستنتج من الدراسة ان للكلوتاثيون تأثير على بعض صفات السائل المنوي للكباش العواسي بتركيز 60 ملغم/ 100 مل.

الكلمات المفتاحية: الكلوتاثيون المختزل، خصائص النطف، تبريد السائل المنوي.

e-mail:husambanana@yahoo.com

Effect of adding different concentrations of reduced glutathione to semen extenders stored at 5C° and storage periods on sperm individual motility and abnormality of Awassi rams

H. J. H. Banana* and H. T. A. Alkhazreji**

***College of Agriculture/ University of Baghdad**

****Directorate of Agriculture in Al-Najaf/ Ministry of Agriculture**

Abstract

This study was carried out during the period from February 2017 to March 2017, in order to determine the effect of adding different levels of reduced glutathione (antioxidant) to diluted the semen of the Awassi rams and their effect on semen traits after cooling at 5C° for five days, Livestock and laboratories affiliated to the

[1] البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

Department of Animal Production/ College of Agriculture/ University of Baghdad in Jadiriyah. In this study, 4 Awassi Rams were used (4-2 years). The semen were collected by the artificial vagina by one ejaculate/ ram/ week, mixed the semen of the rams (Pooled semen) to remove the individual variations between the rams and tests were conducted to evaluate the fresh semen before the dilution in terms of color, viscosity, pH, mass motility, individual motility, sperm concentration and the percentage of viable and abnormal sperms. The sample was divided equally on the experimental parameters using Tris diluent at 1: 10 dilution, which consisted of three groups added to it: **T1**: control group (Tris diluted). **T2**: Tris dilute + glutathione (30 mg/ 100 ml). **T3**: Tris dilute + glutathione (60 mg/ 100 ml). The results showed that the addition of reduced glutathione T3 resulted in a high significant ($p<0.01$) in the characteristics of the individual movement ratio and the rate of the abnormal sperms at the conservation time of 96 hours, reaching (57.00±7.77, 25.75 ± 0.67)% respectively, Compared with control treatment (15.00± 2.88, 41.25± 0.75)% respectively. As for the impact of the duration of conservation on the individual motility, was the effect of the time of conservation at time (0 hour) is not significant ($P <0.05$), and high significant ($P <0.01$) at time (24, 48, 72, 96) hours. as about the effects on the abnormal sperm, it was high significant ($P <0.01$) on all treatments in all times. It was concluded from this study that addition of glutathione in a concentration of 60 mg/ 100ml was beneficial on semen traits of Awassi ram.

Keywords: reduced glutathione, parameters of sperm, semen cooling.

المقدمة

لتلبية الحاجة الماسة في نشر التراكيب الوراثية المتميزة، لذا فقد اتجهت الأنظار نحو التوسع في استخدام تقانة التلقيح الاصطناعي (Artificial Insemination)(AI)(1)، وإن عمليات حفظ السائل المنوي المخفف في درجات حرارة منخفضة تساعد في إطالة حياة النطف من خلال إبطاء عملية الايض وكذلك منع النمو البكتيري (2)، وبما ان جميع المكونات الخلوية التي تتضمن الدهون والبروتينات والأحماض النووية والسكر، تمثل أهداف محتملة لإجهاد الأكسدة (3)، وهو احد العوامل التي قد تؤثر على خصوبة الذكور، وقد يؤدي الى اضطراب في التوازن الدقيق بين إنتاج أنواع الأوكسجين التفاعلي (ROS) وبين مضادات الأكسدة المتأصلة في أي نظام في الجسم (4)، إذ يحتوي الغشاء البلازمي للنطف على تراكيز عالية من الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة (PUFA)(Polyunsaturated fatty acid)، والتي تكون عرضة لعملية الأكسدة، وكذلك تجاوبها العالي مع أكسدة الدهون (Lipid Peroxidative) (LPO)، التي بدورها تؤدي الى خسارة متتالية في الحركة وسلامة الغشاء والقابلية الإخصابية وتضرر DNA والتغيرات الأيضية في الخلايا المنوية(5، 6)، فعمليات التبريد والتجميد الإذابة تولد إجهاداً طبيعياً وكيميائياً على غشاء النطفة وهذا بدوره يقلل من حيوية النطف (7) وقدرتها الإخصابية (8)، كما ان أنجاز عملية التلقيح الاصطناعي لازالت تعتمد على نوعية وكمية السائل المنوي الطبيعي ومدى تحمله لعمليات التخفيف والخزن بما يضمن الحد الأدنى من فقدان القدرة الإخصابية (9). ويمكن تحسين حيوية النطف وبالتالي القابلية الإخصابية عبر إضافة مضادات الأكسدة الى أوساط التجميد (10)، والتي تستخدم كاستراتيجية لتقليل الاثار الضارة للمستويات العالية من أنواع الأوكسجين التفاعلي (ROS) في مخففات السائل المنوي المبرّد (11، 12، 13). ويعد الكلوتاثيون أحد أنواع مضادات الأكسدة المستخدمة في حفظ عينات السائل المنوي المحفوظ بالتبريد، إذ أثبتت الدراسات تأثيراته المفيدة في تحسين خصائص السائل المنوي وكذلك زيادة نسبة نجاح الإخصاب المختبري (In vitro fertilization) (IVF) (14، 15)، والذي هو مركب كبريتي عضوي ثلاثي الببتيد يتألف من ثلاثة أحماض أمينية (كلوتاميل- سستين- كلايسين) ويتواجد في الخلايا الجسمية والجنسية

لجسم الحيوان، وله العديد من الوظائف الحيوية، وان مجموعة الثيول (SH) لها دور بارز في العمليات المضادة للأكسدة للمركبات ذات المنشأ الداخلي والخارجي، وكذلك إدامة عمليات الأكسدة والاختزال (Redox) (16)،ويعمل كمادة حماية من التجميد خلال تجميد السائل المنوي (17). وان الهدف من الدراسة هو لتسليط الضوء على تأثير الكلوتاثيون في بعض صفات السائل المنوي المحفوظ بالتبريد للكباش العواسي.

المواد وطرائق العمل

أجريت الدراسة الحالية في الحقل الحيواني ومختبرات قسم الإنتاج الحيواني– كلية الزراعة – جامعة بغداد في الجادرية للمدة من شباط 2017 وحتى آذار 2017، بهدف اختبار إضافة الكلوتاثيون المختزل إلى مخفف السائل المنوي وتأثيره على صفات السائل المنوي المحفوظ على درجة حرارة 5 مْ لمدة 5 أيام، واستخدمت فيها 4 كباش من سلالة العواسي المحلي تتراوح أعمارها بين 2–4 سنوات وأوزانها بين 54–62 كغم، تم تدريبها على جمع السائل المنوي بطريقة المهبل الاصطناعي(AV) Artificial Vagina، وتم الجمع بواقع قذفة/ كبش/ أسبوع، إذ يتم تهيئة الكباش للقيام بوثبة كاذبة (False mount) لزيادة رغبتها الجنسية (18)، وتم تحفيز الكباش جنسياً باستخدام هرمون الأستروجين (Estradiol Benzoate) عن طريق الشم، تم تجميع السائل المنوي ومزجه مع بعض (Pooled Semen) من أجل إزالة الفروق الفردية بين الكباش، كما تم إجراء الفحوص اللازمة لتقييم السائل المنوي الطازج من حيث الأس الهيدروجيني (pH)، تركيز النطف في القذفة، الحركة الجماعية، الحركة الفردية وكذلك نسبة النطف الحية والمشوهة، ومن ثم تقسيم السائل المنوي باستخدام مخفف Tris والذي تم إعداده مسبقاً حسب طريقة (19). وكانت مستويات الكلوتاثيون في ثلاث معاملات وكالاتي:T1: مجموعة السيطرة (مخفف Tris + 0 مل كلوتاثيون). T2: مخفف Tris+ كلوتاثيون (30 ملغم/ 100 مل). T3: مخفف Tris+ كلوتاثيون (60 ملغم/ 100 مل). وكانت جميع الكباش الداخلة في التجربة تتمتع بصحة جيدة وخالية من الأمراض وخاضعة للأشراف البيطري وإلى نظام غذائي موحد، إذ يقدم لها العلف الأخضر يوميا والعلف المركز بمعدل 300 غم/ حيوان/ يوم. واستخدم البرنامج الإحصائي SAS- Statistical Analysis System (20) في التحليل الاحصائي، على أساس التصميم العشوائي المتكامل (CRD) Completely Randomized Design)) لدراسة تأثير المعاملات المذكورة في صفات السائل المنوي المختلفة، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار Duncan (21) متعدد الحدود.

النتائج والمناقشة

- **نتائج صفات السائل المنوي المدروسة قبل المعاملة (Fresh):** يبين الجدول (1) المتوسط العام لفحوصات السائل المنوي لكباش التجربة والمتمثلة باللون والقوام وحجم القذفة ودرجة الأس الهيدروجيني والحركة الجماعية والحركة الفردية وتركيز النطف ونسبة النطف الميتة والمشوهة وسلامة الجسيم الطرفي.

جدول(1) صفات السائل المنوي المدروسة قبل المعاملة (Fresh) (المتوسط ± الخطأ القياسي)

التسلسل	الصفة	المتوسط ± الخطأ القياسي
1	اللون	كريمي
2	القوام	كثيف
3	الأس الهيدروجيني pH	0.07± 6.62
4	نسبة الحركة الجماعية (%)	1.21 ± 92.24
5	نسبة الحركة الفردية (%)	1.26±91.22
6	نسبة النطف الميتة(%)	0.60 ± 4.32
7	نسبة النطف المشوهة (%)	0.48± 3.90
8	سلامة الجسيم الطرفي (%)	0.32±95.25
9	تركيز النطف ($\times 10^9$)	2.23 ± 2.920

- **الحركة الفردية:** يشير الجدول (2) إلى تأثير إضافة مستويات مختلفة من الكلوتاثيون على النسبة المئوية للحركة الفردية للنطف عند الحفظ على درجة حرارة 5 مْ، إذ يتضح من الجدول (2) وجود تفوق معنوي (0.01 >P) واضح للمعاملتين على حساب معاملة السيطرة، إذ تفوقت المعاملة T3 على المعاملة الأخرى في جميع الأوقات (0، 24، 48، 72 و96 ساعة) ساعة، إذ بلغت (90.00 ± 2.04 و82.50 ± 5.95 و ± 5.54 76.25 و66.25 ± 5.54 و 57.50 ± 7.77)% على التوالي، مقارنة بمعاملة السيطرة (82.50 ± 4.78 و60.00 ± 4.65 و42.50 ± 4.78 و27.50 ± 3.22 و15.00 ± 2.88)% على التوالي. في حين كان تأثير وقت الحفظ عند الزمن (0 ساعة) غير معنوي، وعالي المعنوية (0.01 >P) عند الزمن (24، 48، 72 و96 ساعة)، جدول (2). ويأتي تفوق المعاملة T3 التي تم إضافة الكلوتاثيون إليها بتركيز (60 ملغم/ 100 مل) تفوقا عالِ المعنوية (0.01 >P)، إذ تعتمد حركة النطف على قدرتها على التمثيل الغذائي (المايتوكوندريا)، إذ ان الطاقة الناتجة من عملية الفسفرة التأكسدية في غشاء مايتوكوندريا الخلية هي التي تسبب حركة النطف، وبما ان الحفظ بالتبريد مرتبط أساساً بتضرر المايتوكوندريا وبالتالي انخفاض الأيض، وهذا بدوره يؤدي إلى انخفاض حركة النطف(22، 23، 24)، وهنا يأتي دور الكلوتاثيون (GSH) الذي يشترك في حماية النطف ضد ضرر الأكسدة، إذ يمكنه ان يكتسح جذر بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 المتولد من الخلايا المنوية ويمنع أكسدة الدهون(25، 26)، أو ربما يعود إلى ان الكلوتاثيون يعد خط دفاع من المستوى الأول ضد تكوّن الجذور الحرة وأنواع الأوكسجين التفاعلي (27). وقد اتفقت هذه النتائج مع ما جاء به (28) من ان إضافة 2 ملي مول من الكلوتاثيون إلى مخفف السائل المنوي للكباش المحفوظ بالتبريد على درجة حرارة 5 مْ قد تفوقت على التركيز 0.5 ملي مول وتساوت مع التركيز 1 ملي مول، فقد حسنت من نسبة الحركة التقدمية بعد 96 ساعة من الحفظ، إذ بلغت (50±5.0%) مقارنة بمعاملة السيطرة (20±5.0%)، واتفقت مع ما أورده (29) من ان إضافة 2 ملي مول قد حسّنت معنوياً (0.05>P) من الحركة الفردية لنطف السائل المنوي المحفوظ بالتبريد على درجة 5 مْ لثيران الهولشتاين، ولم تتفق نتائجنا مع ما أورده (30) الذين لم يجدوا فروقاً معنوية لنسبة الحركة الفردية عند إضافة 0.5 و1 ملي مول من الكلوتاثيون مقارنة مع مجموعة السيطرة، في حين انخفضت الحركة الفردية معنوياً (0.05>P) عند إضافة 2 ملي مول من الكلوتاثيون إلى مخفف Bioxcell لدى ثيران الجاموس مقارنة مع مجموعة السيطرة.

جدول (2) تأثير مستويات مختلفة من الكلوتاثيون ومدة الحفظ بالتبريد على درجة 5 مْ على الحركة الفردية (%) للسائل المنوي للكباش العواسي. (المتوسط ± الخطأ القياسي).

المعاملة	الوقت (ساعة)					مستوى المعنوية
	0	24	48	72	96	
T1 Control	4.78 ± 82.50 A a	4.65 ± 60.00 B c	4.78±42.50 C c	3.22±27.50 D c	2.88±15.00 E c	**
T2	6.61±82.50 A a	5.15±63.75 AB bc	7.77±52.50 B bc	7.50±42.50 BC b	7.07±30.00 C bc	**
T3	2.04±90.00 A a	5.95±82.50 AB a	5.54±76.25 ABC a	5.54±66.25 BC a	7.77±57.50 C a	**
مستوى المعنوية	NS	**	**	**	**	-----

** (P<0.01), NS: Non-significant.

القيم تمثل المعدل± S.E، الحروف المختلفة تختلف معنوياً (0.05>P) أو (0.01>P).

- **نسبة النطف المشوهة (%):** يوضح الجدول (3) تأثير مستويات مختلفة من الكلوتاثيون على النسبة المئوية للنطف المشوهة للسائل المنوي للكباش العواسي المحفوظ بالتبريد على درجة حرارة 5 مْ، ونستنتج من الجدول (3) وجود فروق عالية المعنوية (P<0.01) للمعاملتين، فقد تفوقت المعاملة T3 تفوقاً عالِ المعنوية (P < 0.01) على جميع المعاملات بما فيها معاملة السيطرة في وقت الحفظ (48، 72 و96 ساعة)، إذ كانت (18.00 ± 0.40، 21.75 ± 1.89، 25.75 ±0.67%) على التوالي، مقارنة بمعاملة السيطرة (T1) (27.25±1.65، 34.25 ±1.49، 41.25 ±0.75 %) على التوالي. أما بالنسبة لتأثير وقت الحفظ على درجة حرارة 5 مْ فقد كان تأثيره عالي المعنوية (P<0.01) على جميع المعاملات وفي الاوقات جميعها، إذ تزداد نسبة النطف المشوهة (%) بزيادة مدة الحفظ بالتبريد على درجة حرارة 5 مْ ولكن بنسب متفاوتة، جدول(3). وتتفق هذه النتيجة مع ما جاء به (28) اللذين أوضحا ان أضافة 2 ملي مول من الكلوتاثيون المختزل إلى مخفف السائل المنوي لكباش النجدي المحفوظ على درجة حرارة 5 مْ قد خفضت معنوياً (P < 0.05) من نسبة النطف المشوهة (15 ± 2.0%) عند الساعة 96 من الحفظ، بالمقارنة مع إضافة الكلوتاثيون بتركيز 0.5 ملغم/ 1 مل (20 ±5.0 %) وبالمقارنة مع معاملة السيطرة (40±3.0%)، ومساوية لتأثير الكلوتاثيون بتركيز 1 ملي مول، ويعزى ذلك إلى ان الآلية التي يعمل بها الكلوتاثيون تنسب إلى أنزيم الكلوتاثيون بيروكسيديز GPX الذي يعمل على خفض الهايدروبيروكسيدات الدهنية أو غير الدهنية وبيروكسيد الهيدروجين H2O2 من خلال أكسدة جزيئتين من الكلوتاثيون، وبالتالي فان زيادة تركيز الكلوتاثيون سوف تزيد من سرعة التفاعل وتحسّن من حماية خلية النطفة(31). وان زيادة تركيز الكلوتاثيون سوف تخفض من ظهور أنواع الأوكسجين التفاعلي ROS وتزيد من حركة وحيوية النطف(32، 33)، إذ يعتقد ان الكلوتاثيون يقوم بحماية حيوية النطف من خلال اكتساحه لبيروكسيدات الدهن، إذ ان هذه البيروكسيدات التي هي كقوى مؤكسدة يمكنها ان تبدأ سلسلة من التفاعلات التي من شأنها ان تحطم الغشاء الخلوي للنطفة مؤدية إلى شيخوخة الخلية (34).

جدول (3) تأثير مستويات مختلفة من الكلوتاثيون ومدة الحفظ بالتبريد على درجة حرارة 5مْ على النطف المشوهة (%) للسائل المنوي للكباش العواسي (المتوسط± الخطأ القياسي).

المعاملات	الوقت (ساعة)					مستوى المعنوية
	0	24	48	72	96	
T 1 **Control**	2.53±12.50 E a	2.04±19.00 D a	1.65±27.75 C a	1.49±34.25 B a	0.75±41.25 A a	**
T 2	0.64±11.50 E b	0.28±15.50 D b	0.86±22.50 C b	0.70±28.00 B b	0.62±34.75 A b	**
T 3	0.62±11.75 E b	0.40±15.00 D b	0.40±18.00 C c	1.89±21.75 B c	0.67±25.75 A c	**
مستوى المعنوية	**	**	**	**	**	-----
** (**P<0.01**).						

القيم تمثل المعدل± S.E، الحروف المختلفة تختلف معنوياً (P<0.05) أو (P<0.01).

نستنتج مما سبق ان إضافة الكلوتاثيون المختزل بوصفه مضاد أكسدة صناعي بتركيز (60 ملغم/ 100 مل) الى مخفف Tris أدى إلى تحسن في صفات النطف المحفوظة بالتبريد لدى الكباش العواسي قيد الدراسة، وإمكانية استخدامها مستقبلاً في زيادة نسبة الخصوبة لدى الأغنام الملقحة اصطناعياً، أما بالنسبة لتأثير مدة الحفظ فقد كانت عالية المعنوية (P<0.01) على الصفتين في جميع أوقات الحفظ، باستثناء تأثير مدة الحفظ على الحركة الفردية في زمن الحفظ (0 ساعة) فقد كانت غير معنوية.

المصادر

1. Albiaty, N. M. H.; Alobaidi, H. J. K.; Kareem, A. F.; Al-Hakim, A. M.; Alnaeb, A. Y. & Alkhazraji, A. A. H. (2015). Effect of extenders and preservation periods in some semen characteristics of awassi rams. World J. Pharam. Res., 5(2): 234-243.
2. Morrell, J. M.; Klein, C.; Lundeheim, N.; Erol, E. & Troedsson, M. H. T. (2014). Removal of bacteria from stallion semen by colloid centrifugation. Anim. Reprod. Sci., 145(1-2): 47-53.
3. Agarwal, A.; Makker, K. & Sharma, R. (2008). Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. Am. J. Reprod. Immunol., 59(1): 2-11.
4. Chaudhari, A. R.; Das, P. & Singh, R. (2008). Study of oxidative stress and reduced glutathione levels in seminal plasma of human subjects with different fertility potential. Biomed. Res., 19(3):207-210.
5. Peruma, P.; Chamuah, J. K. & Rajkhowa, C. (2013). Effect of catalase on the liquid storage of mithun (*Bos frontalis*) semen. Asian Pac. J. Reprod., 2(3): 209-214.
6. Büyükleblebici, O.; Büyükleblebici, S.; Taşdemir, U. & Tuncer, P. B. (2016). The Effects of Different Antioxidants on Post-thaw Microscopic and Oxidative Stress Parameters in the Cryopreservation of Brown-Swiss Bull Semen. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg., 22 (1): 101-107.
7. Zhang, X. G.; Liu, Q.; Wang, L. Q.; Yang, G. S. & Hu, J. H. (2016). Effects of glutathione on sperm quality during liquid storage in boars. Anim. Sci. J., 87(10):1195-1201.
8. Stradaioli, G.; Noro, T.; Sylla, L. & Monaci, M. (2007). Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. Theriogenology, 67(7):1249-1255.
9. Tuncer, P. B.; Büyükleblebici, S.; Eken, S.; Taşdemir, U.; Durmaz, E.; Büyükleblebici, O. & Coşkun, E. (2014). Comparison of cryoprotective effects of Lycopene and cysteamine in different cryoprotectants on bull semen and fertility results. Reprod. Domest. Anim., 49(5): 746-752.
10. de Oliveira, R. A.; Wolf, C. A.; de Oliveira, M. A.; Gambarini, M. L. (2013). Addition of glutathione to an extender for frozen equine semen. J. Equine Vet. Sci., 33(12):1148-1152.
11. Zanganeh, Z.; Zhandi, M.; Zare-Shahneh, A.; Najafi, A.; Nabi, M. M. & Mohammadi-Sangcheshmeh, A. (2013). Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? Small Rumin. Res., 114(1): 120-125.
12. Ghadimi, V.; Zhandi, M.; Towhidi, A.; Shehab-El-Deen, M. A. M. M. & Nouri, H. (2014). Positive effect of manganese (III) meso-tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin on stallion spermatozoa during storage in cool condition. J. Equine Vet. Sci., 34(11-12): 1329-1332.
13. Sharafi, M.; Zhandi, M. & Akbari-Sharif, A. (2014). Supplementation of soybean lecithin-based semen extender by antioxidants: complementary flowcytometric study on post-thawed ram spermatozoa. Cell Tissue Bank, 16(2): 261-269.
14. Abeydeera, L. R. (2002). In vitro production of embryos in swine. Theriogenology, 57(1):256-273.
15. Jiang, Z. L.; Li, Q. W.; Li, W. Y.; Hu, J. H.; Zhao, H. W. & Zhang, S. S. (2007). Effect of low density lipoprotein on DNA integrity of freezing-thawing boar sperm by neutral comet assay. Anim. Reprod. Sci., 99(3-4): 401-407.
16. Oliveira, R. A.; Piersanti, R. L.; Wolf, C. A.; Viu, M. A. O. & Gambarini, M. L. (2014). Glutathione for the freezing of cooled equine semen, using different protocols. Anim. Reprod., 11 (2):104-109.
17. Munsi, M. N.; Bhuiyan, M. M.; Majumder, S. & Alam, M.G. (2007). Effects of exogenous glutathione on the quality of chilled bull semen. Reprod. Domest. Anim., 42(4): 358-362.
18. Badawy, A. M.; Yaseen, A. M.; El-Bashary, A. S. & Ibrahim, M. A. (1975). Effect of sexual preparation on some characteristics of the semen of buffaloes and cattle bulls. Alexandria J. Agric. Res, 21:185-191.(Anim. Breed. Abstr,43:1055).

19.Moce, E.; Blanch, E.; Tomas, C. & Graham, J. K. (2010). Use of cholesterol in sperm cryopreservation: Present moment and perspectives to future. Reprod. Domest. Anim., 45(Suppl. 2):57- 66.
20.SAS. (2012). Statistical Analysis System. Users Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C.,USA.
21.Duncan, D. B. (1955). Multiple Ranges and Multiple F-test. Biometrics, 11:4-42.
22.Ruiz-Pesini, E.; Alvarez, E.; Enriquez, J. A. & Lopez-Perez, M. J. (2001). Association between seminal plasma carnitine and sperm mitochondrial enzymatic activities. Int. J. Androl., 24(6): 335-340.
23.Januskauskas, A. & Zillinskas, H. (2002). Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. Veterinarija ir zootechnika,17(39): 1392-2130.
24.Al-Dulimi, A. Y. S. (2016). Effect of using of some preservatives and various cryopreserved technology in reducing DNA fragmentation and mitochondrial apoptosis in Turkish Awassi sperm. Ph.D dissertation College of Agriculture- University of Baghdad.
25.Baker, M. A. & Aitken, R. J. (2004). The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. Mol. Cell. Endocrinol., 216(1- 2): 47-54.
26.Maia M da, S.; Bicudo, S. D.; Sicherle, C. C.; Rodello, L. & Gallego, I. C. (2010). Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in Frozen-Thawed ram semen cryopreserved in extenders with Anti-Oxidants. Anim. Reprod. Sci., 122(1-2): 118-123.
27.Surai, P. F. (1999). Vitamin E in avian reproduction. Poult. Avian Biol. Rev., 10:1- 60.
28.Zeitoun, M. M. & Al-Damegh, M. A. (2015). Effect of nonenzymatic antioxidants on sperm motility and survival relative to free radicals and antioxidant enzymes of chilled-stored ram semen. Open Journal of Animal Sciences, 5: 50-58.
29.Al-Zaidi, O. H. A. (2014). Adding some antioxidants and Omeaga3 to Tris extender and its influence in improving post-cryopreservation semen characteristics of Holstein bulls. M.Sc. Thesis to College of Agriculture- University of Baghdad.
30.Rastegarnia, A.; Shetabi, N.; Topraggaleah, T. R. & Nasiri, Y. (2012). Effect of exogenous glutathione supplementation in Bixcell extender on quality cryoperserved buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. J. Anim. Vet. Adv., 11(18): 3437- 3443.
31.Flohe, L.; Gunzler, W. A. & Schock, H. H. (1973). Glutathione Peroxidase: A Selenoenzyme. FEBS Lett., 32(1): 132-134.
32.de Matos, D. G.; Gasparrini, B.; Pasqualini, S. R. & Thompson, J. G. (2002). Effect of glutathione stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. Theriogenology. 57(5): 1443-1451.
33.Feugang, J. M.; de Roover, R.; Moens, A.; Léonard, S.; Dessy, F. & Donnay, I. (2004). Addition of beta-mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. Theriogenology. 61(1): 71-90.
34.Ansari, M. S.; Rakha, B. A.; Ullah, N.; Andrabi, S. M. H.; Iqbal, S.; Khalid, M. & Akhter, S. (2010). Effect of exogenous glutathione in extender on the freezability of Nili-Ravi Buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. Animal Science Papers and Reports, 28(3): 235-244.