تأثير إضافة المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل *Melissa officinalis* وبعض مضادات الأكسدة الأخرى وخليطهم إلى مخفف الحليب في النسبة المئوية لحركة النطف الفردية والحية لثيران الهولشتاين بعد مدد مختلفة من الحفظ بالتبريد والتجميد

طلال أنور عبد الكريم وعمر حسين الزيدي[1]

قسم الإنتاج الحيواني/ كلية الزراعة- جامعة بغداد

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة بهدف بيان تأثير إضافة المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل *Melissa officinalis* وبعض مضادات الأكسدة وخليطهم إلى مخفف الحليب في النسبة المئوية لحركة النطف الفردية والحية بعد الحفظ بالتبريد والتجميد لمدد مختلفة. نفذت هذه الدراسة في قسم التلقيح الاصطناعي في أبو غريب التابع لدائرة الثروة الحيوانية/ وزارة الزراعة للمدة من تشرين الأول 2015 وحتى تشرين الأول 2016 أُستعمل في هذه الدراسة عشرة ثيران هولشتاين بالغة بأعمار تتراوح ما بين 2.5- 3 سنة، وتم جمع السائل المنوي منها بواسطة المهبل الاصطناعي بواقع قذفه/ ثور/ أسبوع وإجراء الفحوصات اللازمة لتقييمه، ومن ثم تم تجميعه للثيران جميعها (Pooled semen) وتقسيمه بالتساوي على المجاميع العشرة المختلفة ضمن التجربة الواحدة، ضمن هذه التجربة أضيف إلى المجموعة الأولى (A1) مخفف الحليب فقط وعَدت بمثابة مجموعة سيطرة، في الوقت الذي أضيف مع مخفف الحليب 0.062 ملغم/ 100 مل من المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل في المجموعة الثانية (A2)، 0.031 ملي مول من المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل + 5 ملي مول فيتامين C في المجموعة الثالثة (A3)، 0.062 ملغم/ 100 مل من المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل +0.08 ملي مول من مركب Trolox في المجموعة الرابعة (A4)، 0.062 ملغم/ 100 مل من المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل+ 100 وحدة دولية أنزيم الكاتليز في المجموعة الخامسة (A5)، 100 وحدة دولية أنزيم الكاتليز في المجموعة السادسة (A6)، 5 ملي مول من فيتامين C في المجموعة السابعة (A7)، 0.08 ملي مول من مركب Trolox في المجموعة الثامنة (A8)، 0.2 ملي مول فيتامين E في المجموعة التاسعة (A9) و0.062 ملغم/ 100 مل من المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل +0.2 ملي مول من فيتامين E ضمن المجموعة العاشرة (A10). تم دراسة تأثير هذه الإضافات في صفات السائل المنوي لثيران الهولشتاين خلال مدد حفظ زمنية مختلفة (التبريد عند درجة حرارة 5°م وتجميد بعد 48 ساعة وشهر وشهرين وثلاثة اشهر). بينت نتائج التجربة ان إضافة المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل ضمن المجموعة A2 أدى إلى زيادة معنوية ($P\leq 0.01$) في النسب المئوية لكل من الحركة الفردية والنطف الحية مقارنةً بمجموعة السيطرة A_1 لكافة مدد الحفظ بالتبريد والتجميد. كما أدت إضافة خليط من المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل وفيتامين C في المجموعة A4 إلى زيادة ملحوظة في النسبة المئوية لحركة النطف الفردية والحية لمدد مختلفة من الحفظ بالتجميد قياساً بمجموعة السيطرة. من جانب آخر، كان لإضافة خليط من المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل وأنزيم الكاتليز في المجموعة A5 إلى زيادة كل من النسب المئوية لحركة النطف الفردية والحية بعد مدد الحفظ المختلفة للدراسة، في حين كان لإضافة فيتامين E لوحده في المجموعة A9 أو مع المستخلص المائي لأوراق حشيشة النحل في المجموعة A10 تأثيراً معنوياً ($P\leq 0.01$) واضحاً في تحسين جميع صفات السائل المنوي المدروسة وبشكل متميز

[1] البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الثاني

قياساً بمجموعة السيطرة طيلة مدد الحفظ المختلفة. يمكن الاستنتاج بأن إضافة المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل لوحده أو مع أنواع أخرى من مضادات الأكسدة الصناعية إلى مخفف الحليب كان له دور فعال في تحسين النسبة المئوية لحركة النطف الفردية والحية لثيران الهولشتاين بعد حفظها لمدد زمنية مختلفة من التبريد والتجميد في تحسين معدل الحمل للأبقار الملقحة لمعظم المجاميع المعاملة وبالتالي زيادة نسبة الولادات وزيادة العائد الاقتصادي لمربي الأبقار في العراق.

الكلمات المفتاحية: المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشه النحل، مضادات أكسدة، النسبة المئوية لحركة النطف الفردية والحية، ثيران الهولشتاين.

e-mail: talal200320032000@yahoo.com

Effect of adding aqueous extract of *Melissa officinalis* leaves and some other antioxidants to milk–based extender on post-cooling and post-cryopreservative sperm's individual motility and live sperm percentage of Holstein bulls

Talal Anwer Abdulkareem and Omar Hussain Alzaidi
Department of Animal Production, College of Agriculture, University of Baghdad

Abstract

This study was conducted to explore the effect of adding aqueous extract of Melissa officinalis leaves (AEMOL), some antioxidants and their combinations to the milk-based extender for increase on sperm's cells individual motility percentage on and live sperms percentage semen for Holstein bulls following different preservation periods. The study was executed at the Department of Artificial Insemination, Abu-Ghraib belong to the Directorate of Animal Resource, Ministry of Agriculture, during the period from October 2015 to February 2016 using ten Holstein bulls of 2.5-3 years old. Semen was collected via artificial vagina in one ejaculate per bull per week for the 7-week experimental period. Pooled semen was equally divided into ten groups within one experiment. In this experiment, AEMOL (0.062mg/100 ml; A2), WEMOL (0.031 mM) + 5 mM of vitamin C (A3), AEMOL (0.062mg/100 ml + 0.08 mM of Trolox (A4),AEMOL (0.062mg/100 ml + 100 IU of catalase (A5),100 IU of catalase (A6), 5 mM of vitamin C (A7), 0.08 mM of Trolox (A8), 0.2 mM of vitamin E (A9) and AEMOL (0.062mg/100 ml +0.2 mM of vitamin E (A10). The effect of these additives on semen characteristics of Holstein bulls for different preservation periods (cooling at 5◦C, 48 hrs., 1, 2 and 3 months post cryopreservation, PC) were studied. The A2 group exhibited greater ($P \leq 0.01$) sperm's cell individual motility, live sperm percentage, as compared with A1 group at all preservation periods. Greater sperm's cells individual motility, live sperm percentage noticed in A4 group in comparison with the A1 group at all preservation time periods. On the other hand, A5 group exhibited greater ($P \leq 0.01$) sperm's cell individual motility, live sperm percentage, as well as, adding of vitamin E alone (A9) or combined with AEMOL (A10) to milk-based extender had a positive ($P \leq 0.01$) effect in improving sperm's cell individual motility and live sperm percentage at all preservation time periods. In conclusion, adding of AEMOL as alone or combined with the other synthetic antioxidants to milk-based extenders had a crucial role in improving PC sperm's cell individual motility and live sperm percentage of Holstein bulls. This was reflected positively on increasing pregnancy rates of the inseminated cows.

Key words: Aqueous extract of *Melissa officinalis* leaves, antioxidants, sperm's cell individual motility and live sperm percentage, 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 (damage, DNA)، 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). لقد ازداد الاهتمام في الآونة الأخيرة باستخدام مضادات الأكسدة الطبيعية من المستخلصات النباتية لاحتوائها على كميات كبيرة من المركبات الفلافونيدية (Flavonoids) وهي مركبات طبيعية متعددة الفينول (7، 8، 9) تعمل فضلاً عن فعاليتها المضادة للأكسدة كمضادات للفطريات والبكتيريا والفيروسات ومانعة لحدوث الإصابة بالسرطان (10، 11، 12). ويعد نبات حشيشة النحل (*Melissa officinalis*) من النباتات العشبية المعمرة والذي يعود إلى فصيلة النباتات الشفوية (*Lamiaceae*) يتواجد بشكل طبيعي في العراق وبعض دول حوض البحر الأبيض المتوسط وجنوب أوروبا، وهو من اكثر النباتات العشبية الطبيعية احتواءً للمركبات الفينولية في دراسة شملت اكثر من 70 نوعاً من النباتات (13) مقارنة ببقية مضادات الأكسدة الطبيعية والصناعية المعروفة. وهو بذلك ذو فعالية كبيرة كمضاد للأكسدة نظراً لاحتوائه على كميات كبيرة من الفلافونيدات والانثوسيانيدات (14، 15، 16) فضلاً عن تأثيراته المضادة للبكتريا والفيروسات (17). كما 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 (18). إن إضافة فيتامين C إلى مخففات السائل المنوي تجعل أداء نطف الثيران مثالياً (19)، من خلال تحسين حيويتها وحركتها الفردية وقابليتها للتجميد وخفض نسب النطف الميتة والمشوهة (20، 21، 22، 23). من ناحيةٍ أُخرى، يعد فيتامين E المكون الأساس لنظام مضادات الأكسدة غير الأنزيمية في النطفة (24)، فضلاً عن كونه أحد وسائل الحماية الرئيسة للنطف من أنواع الأوكسجين التفاعلي وأكسدة الدهون (25)، إذ بإمكانه تثبيط أكسدة الدهون من خلال إزالة جذر البيروكسيل (Peroxyl) والكوكسيل (Alkoxyl) المشتقة من الدهون لأغشية النطفة (26). وكان لإضافة فيتامين E إلى مخفف الحليب دوراً في زيادة العدد الكلي للنطف ذات الأكروسوم السليم عند كافة مدد الحفظ المختلفة لنطف ثيران الهولشتاين(22). تم إثبات نجاح مخفف الحليب (Milk-based extender) في الحفاظ على خصوبة النطف في ثيران الجاموس (27) والكباش (28) مقارنة بمخفف Tris-egg yolk، إذ أظهرت بروتينات الكازين والبروتينات الأخرى للحليب تأثير وقائي للنطف أثناء الحفظ بالتبريد والتجميد (28). وقد جرت محاولات عديدة لإضافة أنواع عديدة من مضادات الأكسدة إلى مخففات السائل المنوي وتأثيراتها على نوعية السائل المنوي بعد الحفظ بالتجميد لدى ثيران الهولشتاين في العراق (22، 29، 30، 31، 32، 33)، إلا إن نتائج التأثير التآزري لهذه المضادات مع بعضها البعض على النسبة المئوية للاكروسوم السليم للنطف 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 المستخلص المائي للحشيشة النحل وبعض مضادات الأكسدة إلى مخفف الحليب في النسبة المئوية لسلامة الاكروسوم لنطف ثيران الهولشتاين بعد مدد مختلفة من الحفظ بالتبريد والتجميد.

المواد وطرائق العمل

- **الاستخلاص المائي لنبات حشيشة النحل:** أجريت عملية الاستخلاص المائي في المختبرات المركزية لقسم علوم الأغذية/ كلية الزراعة– جامعة بغداد استناداً لما أورده (32)، إذ حفظت أوراق النبات بعد جمعها بصورة مفردة في الظل ومن ثم سحقها وخزنها في أكياس بولي أثيلين محكمة الغلق لحين الاستعمال، علماً أن النبات كان قد شخص وسجل من قبل دائرة فحص وتصديق البذور– المعشب الوطني/ وزارة الزراعة– العراق عام (1920).
- **تقدير المردودية الإنتاجية للمستخلص المائي لنبات حشيشة النحل:** تم تقدير المردودية الإنتاجية للمستخلص المائي من خلال النسبة بين الوزن الجاف للمادة المستخلصة والتي تم الحصول عليها ووزن المادة النباتية الجافة المستخدمة من خلال المعادلة التالية (33): $PR\% = Me/ Mv \times 100$

PR% = المردودية الإنتاجية للمستخلص الكحولي (%)

Me= الوزن الجاف للمادة المستخلصة والتي تم الحصول عليها

Mv= ووزن المادة النباتية الجافة المستخدمة.

- **تقدير السمية الخلوية للمستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل:** تم أجراء فحص السمية الخلوية (Cellular toxicity) للمستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل استنادا لما جاء به (34). وتم ملاحظة نتائج تخثر الدم ووجود الترسبات في المحلول الملحي لمدد زمنية مختلفة (15، 30 و60 دقيقة).
- **تقدير تركيز المركبات الفينولية الكلية للمستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل:** تم تقدير تركيز المركبات الفينولية الكلية للمستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل استنادا لما جاءت به (35) مع بعض التحويرات التي أجراها (36). استعملت تراكيز مختلفة من حامض الكاليك (Gallic acid) لتحديد المنحنى القياسي (Standard curve)، وتم التعبير عن تركيز المركبات الفينولية الكلية للنبات بعدد الملغرامات المكافئة لحامض الكاليك (Gallic acid equivalent; GAE) لكل غرام من المستخلص المائي.
- **حيوانات التجربة وجمع السائل المنوي:** نفذت هذه الدراسة في قسم التلقيح الاصطناعي التابع لدائرة الثروة الحيوانية في منطقة أبي غريب/ وزارة الزراعة (25 كم غرب بغداد) للمدة من تشرين الأول 2015 وحتى تشرين الأول 2016. أستخدم في هذه التجربة عشرة ثيران هولشتاين بالغة ومدربة على جمع السائل المنوي بطريقة المهبل الاصطناعي (Artificial Vagina) بأعمار تتراوح بين 2.5– 3 سنوات وبوزن جسم يتراوح بين 500–750 كغم/ ثور. كانت جميع الثيران بصحة جيدة وخالية من الأمراض وخاضعة للإشراف البيطري بصورة مستمرة. تم وضع السائل المنوي المجمع في حمام مائي على درجة حرارة 37 مْ لحين احتساب النسبة المئوية لسلامة الاكروسوم للنطف وتركيزها. تضمنت الدراسة عملية الجمع والتقييم لمدة سبعة أسابيع لكل ثور.
- **تقييم وحفظ السائل المنوي والمعاملات:** تم جمع السائل المنوي الطازج وإجراء الفحوصات اللازمة لتقييمه (حجم الأس لهيدروجين 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 المختلفة باستخدام مخفف الحليب، وقد تضمنت التجربة المجاميع الآتية: المجموعة الأولى (A1): مجموعة السيطرة والتي تضمنت إضافة السائل المنوي الطازج إلى مخفف الحليب فقط. المجموعة الثانية (A2): تضمنت إضافة السائل المنوي الطازج إلى مخفف الحليب الحاوي 0.062 ملغم/ 100 مل من المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل. المجموعة الثالثة (A3): تضمنت إضافة السائل المنوي الطازج إلى مخفف الحليب الحاوي 0.062 ملغم/ 100 مل من المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل+ فيتامين C (5 مليمول/ مل، L-Ascorbic acid, SCR, China). المجموعة الرابعة (A4): تضمنت إضافة السائل المنوي الطازج إلى مخفف الحليب الحاوي 0.062 ملغم/ 100 مل من المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل+ 0.05 مليمول من مركب Trolox, Sigma –Aldrich, USA)(Trolox وهو

المشابه الصناعي لفيتامين E. المجموعة الخامسة (A5): تضمنت إضافة السائل المنوي الطازج إلى مخفف الحليب الحاوي 0.062 ملغم/ 100 مل من المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل+ إنزيم الكاتليز (100 وحدة دولية/ مل، Sigma–Aldrich, USA). المجموعة السادسة (A6): تضمنت إضافة السائل المنوي الطازج إلى مخفف الحليب+ إنزيم الكاتليز (100 وحدة دولية/ مل، Sigma –Aldrich, USA). المجموعة السابعة (A7): تضمنت إضافة السائل المنوي الطازج إلى مخفف الحليب+ فيتامين C ;5 مليمول/ مل (L-Ascorbic acid, SCR,China). المجموعة الثامنة (A8): تضمنت إضافة السائل المنوي الطازج إلى مخفف الحليب+0.05 مليمول Trolox, Sigma –Aldrich, USA; وهو المشابه الصناعي لفيتامين E). المجموعة التاسعة (A9): تضمنت إضافة السائل المنوي الطازج إلى مخفف الحليب+ فيتامين E (0.2 مليمول/ مل،α Tocopherol BDH, England). المجموعة العاشرة (A10): تضمنت إضافة السائل المنوي الطازج إلى مخفف الحليب الحاوي 0.062 ملغم/ 100 مل من المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل + فيتامين E (0.2 مليمول/ مل، α Tocopherol, BDH, England).

تم تقدير النسبة المئوية لحركة الفردية للنطف لكل المعاملات عند التبريد 5م° و48 ساعة والشهر الأول والثاني والثالث من الحفظ بالتجميد وتم تقدير النسبة المئوية للحركة الفردية على وفق ما جاء به (39، 40) وذلك بأخذ قطرة من السائل المنوي وتخفيفها مع 3 قطرات من محلول سترات الصوديوم بتركيز 2.9% وبنسبة تخفيف 9:1 سائل منوي: محلول سترات الصوديوم في أنبوبة اختبار 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 (41). كما تم حساب النطف الميتة والحية استناداً لما ذكره (42) وذلك بأخذ قطرة صغيرة من السائل المنوي الطازج ووضعها على شريحة زجاجية نظيفة بدرجة حرارة 37 مْ وإضافة قطرة واحدة من مزيج من صبغة ألايوسين (5%) والنكروسين (10%). عملت مسحة على شريحة زجاجية أخرى بزاوية 45 درجة، وفحصت تحت المجهر بقوة تكبير 400x، إذ تظهر النطف الميتة بلون وردي بينما تكون النطف الحية ذات لون شفاف لعدم تقبلها الصبغة، تم حساب 200 نطفة في حقول مختلفة من الشريحة وقدرت النسبة المئوية للنطف الحية في القذفة حسب المعادلة الآتية:

$$\text{النسبة المئوية للنطف الحية} = \frac{\text{عدد النطف الحية}}{\text{العدد الكلي للنطف}} \times 100$$

- **التحليل الإحصائي:** اجري التحليل الإحصائي للنتائج باستخدام البرنامج الإحصائي (43) لدراسة تأثير إضافة كل من المستخلص المائي لحشيشة النحل وفيتامين C وفيتامين E وخليطهما إلى مخفف الحليب في صفة النسبة المئوية لسلامة الاكروسوم لنطف ثيران الهولشتاين لمدد زمنية مختلفة وفق تصميم عشوائي كامل (CRD) باستعمال تجربة عاملية (5x7) 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 =).

μ= المتوسط العام للصفة المدروسة.

T_i= تأثير المجموعة i.

P_j= تأثير فترة الحفظ بالتبريد والتجميد j .

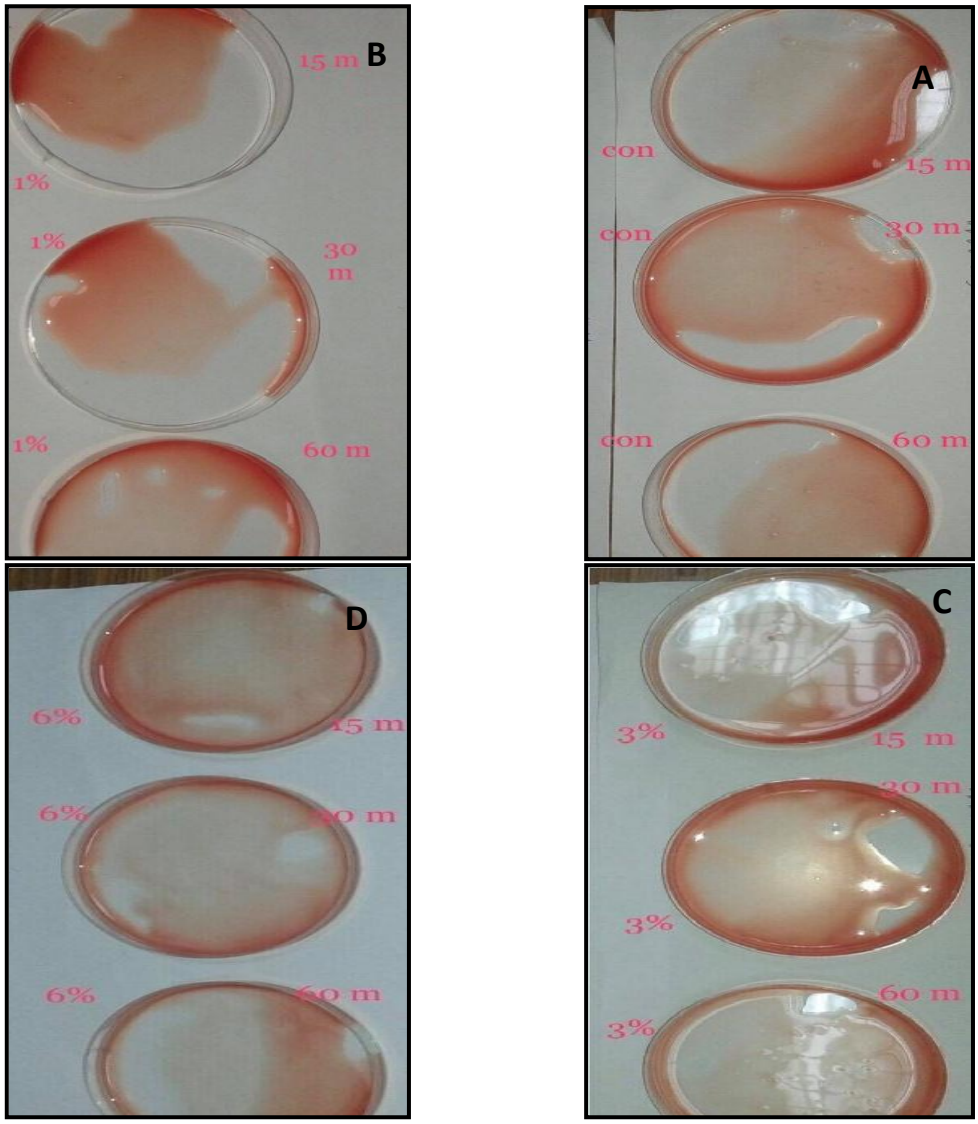
$TP_{(ij)}$= تأثير التداخل ما بين المجموعة والحفظ.

e_{ijk}= الخطأ القياسي.

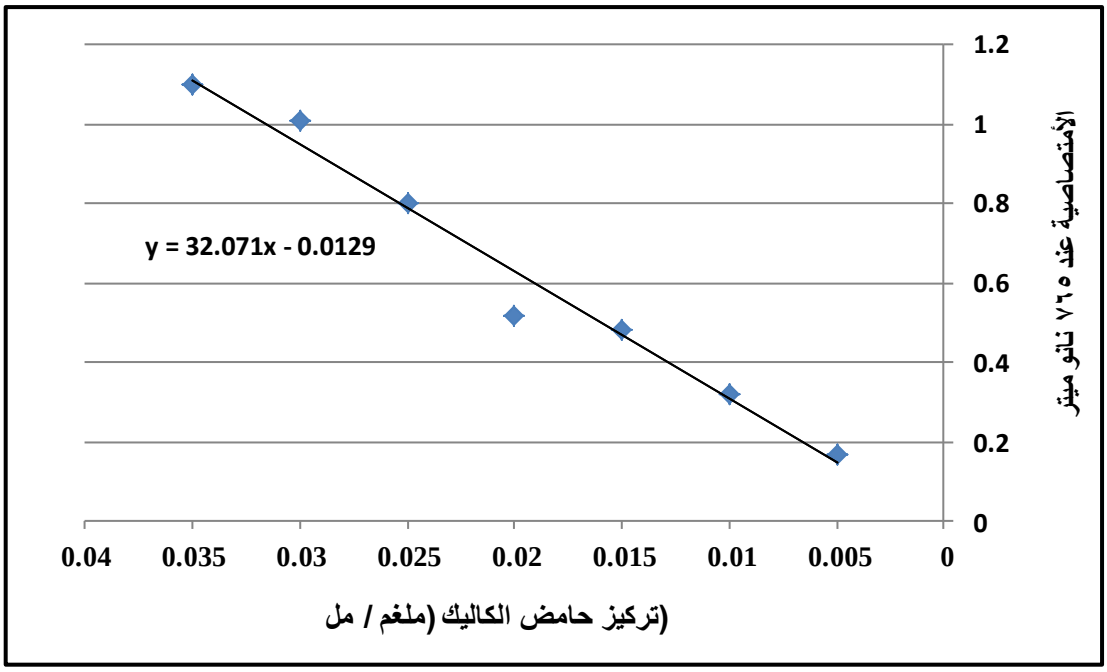
قورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باستعمال أختبار دنكن متعدد الحدود(44).

النتائج

- **المردودية الإنتاجية للمستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل:** بلغت المردودية الإنتاجية للمستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل في دراستنا الحالية 6%، إذ تم الحصول على 15 غم من الوزن الجاف للمادة المستخلصة عند استخدام 250 غم من المادة النباتية الجافة لأوراق نبات حشيشة النحل.
- **السمية الخلوية للمستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل:** يتبين من الصورة (3A, B, C, D) نتائج اختبار فحص السمية الخلوية للمستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل لثلاث مستويات (1، 3 و6%) ومقارنتها مع عينة السيطرة ولثلاث مدد زمنية، إذ لم يلاحظ أي تحلل لكريات الدم الحمراء وعدم وجود ترسبات في المحلول الملحي للمستويات الثلاث التي تم اختيارها وعدم وجود أي تغيرات في شكل الكريات متشابهةً في ذلك مع عينة السيطرة مما يدل على عدم امتلاكها لخواص سمية وتعد بذلك آمنة عند استخدامها في مخففات السائل المنوي.
- **تركيز المركبات الفينولية الكلية للمستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل:** يتضح من خلال المنحنى القياسي لحامض الكاليك (شكل 4) للمستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل ان متوسط تركيز المركبات الفينولية الكلية للمستخلص ومن خلال فحص ثلاث عينات بلغ 45.527 ± 0.555 ملغم من مكافئ حامض الكاليك/ غم من المستخلص.



صورة (1) نتائج فحص السمية الخلوية للمستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل لعينة السيطرة (A)، 1% (B)، 3% (C) و6% (D) ولثلاث مدد زمنية (15، 30 و60 دقيقة).



شكل (1) المنحنى القياسي لحامض الكاليك لتقدير المركبات الفينولية الكلية للمستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل.

- **النسبة المئوية لحركة النطف الفردية:** أوضحت نتائج الدراسة تفوق المعاملتين A5 و A10 معنوياً ($P\leq 0.01$) على جميع المعاملات التجريبية قيد الدراسة باستثناء المعاملتين A2 و A9 اللتين لم تختلفا معنوياً في النسبة المئوية لحركة النطف الفردية خلال مدة الحفظ بالتبريد (جدول1). كما تفوقت المعاملات A2 و A5 و A9 و A10 تفوقاً معنوياً ($P\leq 0.01$) على بقية المعاملات قيد الدراسة للصفة نفسها بعد مرور 48 ساعة من الحفظ بالتجميد، في الوقت الذي سجلت فيه المعاملات A1 (30.83 ± 3.05%) و A7 (31.43 ± 2.37%) و A8 (33.57 ± 2.83%) أوطأ القيم لحركة النطف الفردية (جدول 1). من ناحية أخرى، أظهرت نتائج الدراسة تفوق ($P\leq 0.01$) المعاملة A10 (55.00 ± 1.45%) على جميع معاملات التجربة الأولى باستثناء المعاملتين A5 و A9 في النسبة المئوية لحركة النطف الفردية بعد الشهر الأول من الحفظ بالتجميد، في حين سجلت المعاملات A1 و A3 و A7 و A8 أوطأ القيم لهذه الصفة (جدول 1). وفي الاتجاه نفسه، لوحظ وجود تفوق عالي المعنوية ($P\leq 0.01$) للمعاملة A10 في النسبة المئوية لحركة النطف بعد الشهر الثاني من الحفظ بالتجميد (52.14±1.84%) على المعاملات الأخرى جميعها ومجموعة السيطرة (جدول10). وفي السياق نفسه، تفوقت المعاملات A2 و A5 و A9 و A10 تفوقاً عالي المعنوية ($P\leq 0.01$) على باقي المعاملات قيد الدراسة بعد الشهر الثالث من الحفظ بالتجميد بينما سجلت المجموعة A1 أقل قيمة لهذه الصفة (25± 3.09%) (جدول 1). وعند المقارنة بين مدد الحفظ المختلفة ضمن المعاملة الواحدة، لوحظ انخفاض النسبة المئوية لحركة النطف الفردية معنوياً ($P\leq 0.01$) عند الشهرين الثاني (27.14± 3.06%) والثالث (25± 3.09%) بعد الحفظ بالتجميد مقارنة بالمدتين الباقيتين لدى مجموعة السيطرة (A1)، في الوقت الذي لم تظهر نتائج المعاملة A2 فروقاً معنوية بين مدد الحفظ المختلفة (جدول 1).

جدول (1) تأثير إضافة المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل وبعض مضادات الأكسدة الأخرى وخليطهم إلى مخفف الحليب في النسبة المئوية لحركة النطف الفردية لثيران الهولشتاين الفردية بعد مدد مختلفة من الحفظ بالتبريد والتجميد (المتوسط ± الخطأ القياسي).

المجاميع	المدة					مستوى المعنوية
	بعد التبريد 5 °م	بعد 48 ساعة	بعد شهر	بعد شهرين	بعد ثلاث شهور	
A1	$^{A\,d}$ 2.83 ± 38.57	$^{AB\,c}$ 2.39 ± 30.83	$^{AB\,c}$ 3.09 ± 30.00	$^{B\,cd}$ 3.06 ± 27.14	$^{B\,c}$ 3.09 ± 25.00	P ≤ 0.01
A2	$^{A\,ab}$ 4.08 ± 55.00	$^{A\,a}$ 3.85 ± 49.28	$^{A\,b}$ 3.52 ± 45.71	$^{A\,b}$ 3.85 ± 44.29	$^{A\,a}$ 3.73 ± 43.57	N.S
A3	$^{A\,cd}$ 3.40 ± 41.43	$^{AB\,bc}$ 2.57 ± 35.63	$^{BC\,c}$ 2.37 ± 31.43	$^{BC\,cd}$ 1.70 ± 29.29	$^{C\,bc}$ 1.84 ± 27.14	P ≤ 0.01
A4	$^{A\,cd}$ 3.45 ± 45.00	$^{A\,b}$ 3.27 ± 40.00	$^{A\,c}$ 3.25 ± 37.14	$^{A\,c}$ 2.67 ± 35.00	$^{A\,bc}$ 3.43 ± 32.86	N.S
A5	$^{A\,a}$ 1.49 ± 57.14	$^{B\,a}$ 1.43 ± 51.43	$^{BC\,ab}$1.70 ± 49.29	$^{C\,ab}$ 1.43 ± 46.43	$^{C\,a}$ 1.43 ± 46.43	P ≤ 0.01
A6	$^{A\,bc}$ 3.25 ± 47.86	$^{AB\,b}$ 2.83 ± 41.43	$^{B\,c}$ 3.43 ± 37.14	$^{B\,c}$ 2.89 ± 35.00	$^{B\,b}$ 3.03 ± 33.57	P ≤ 0.01
A7	$^{A\,d}$ 2.14 ± 37.14	$^{A\,c}$ 2.37 ± 31.43	$^{A\,c}$ 2.67 ± 30.00	$^{A\,d}$ 2.37 ± 26.43	$^{A\,bc}$ 2.14 ± 27.14	N.S
A8	$^{A\,d}$ 2.64 ± 37.86	$^{A\,bc}$ 2.83 ± 33.57	$^{A\,c}$ 3.06 ± 32.86	$^{A\,cd}$ 2.97 ± 29.29	$^{A\,bc}$ 2.97 ± 29.29	N.S
A9	$^{A\,ab}$ 1.89 ± 55.00	$^{AB\,a}$ 1.89 ± 50.00	$^{BC\,ab}$1.84 ± 47.86	$^{C\,b}$ 1.70 ± 44.29	$^{C\,a}$ 1.70 ± 44.29	P ≤ 0.01
A10	$^{A\,a}$ 1.84 ± 62.14	$^{AB\,a}$ 2.14 ± 57.14	$^{B\,a}$ 1.54 ± 55.00	$^{B\,a}$ 1.84 ± 52.14	$^{B\,a}$ 1.80 ± 51.43	P ≤ 0.01
مستوى المعنوية	P ≤ 0.01	P ≤ 0.01	P ≤ 0.01	P ≤ 0.01	P ≤ 0.01	

المتوسطات التي تحمل حروفاً صغيرة ضمن العمود الواحد تشير إلى المقارنة بين المجاميع، والمتوسطات التي تحمل حروفاً كبيرة ضمن السطر الواحد تشير للمقارنة بين المدد المختلفة ضمن المجموعة الواحدة. N.S: غير معنوية

- **النسبة المئوية للنطف الحية:** أوضحت نتائج الدراسة وجود زيادة معنوية ($P\leq0.01$) في النسبة المئوية للنطف الحية لدى المجموعتين A2 و A10 مقارنة بالمجاميع A3 و A4 و A7 و A8 في الوقت الذي لم تختلف فيه هذه النسبة معنوياً مع بقية المجاميع خلال مدة الحفظ بالتبريد (جدول2). من جانب آخر، سجلت المجاميع A2 و A5 و A9 و A10 أعلى ($P\leq0.01$) نسبة مئوية للنطف الحية مقارنة بالمجاميع قيد الدراسة بعد مرور 48 ساعة من الحفظ بالتجميد، في الوقت الذي لم تختلف فيه المجاميع A3 (52.55 ± 3.52%) و A7 (51.19 ± 1.68%) و A8 (53.73±1.30%) فيما بينها معنوياً مع كونها سجلت أوطأ القيم بعد 48 ساعة من الحفظ بالتجميد (جدول 2). وبتقدم مدة الحفظ بالتجميد تفوقت المجاميع A2 و A5 و A9 و A10 مقارنة بالمجاميع الأخرى، في حين سجلت المجاميع A3 و A7 و A8 أوطأ القيم للصفة المدروسة بعد مرور شهر وشهرين وثلاثة اشهر من الحفظ بالتجميد (جدول 2). ولم تختلف النسبة المئوية للنطف الحية معنوياً بين مدد الحفظ المختلفة ضمن المجاميع A2 و A5 و A9 و A10(جدول2). من ناحية أخرى، انخفضت هذه النسبة معنوياً ($P\leq0.01$) بعد مرور شهر وشهرين وثلاثة أشهر من الحفظ بالتجميد مقارنة بالحفظ بالتبريد لدى المجموعة A1. كما انخفضت النسبة المئوية للنطف الحية معنوياً ($P\leq0.01$) بعد مرور شهر وشهرين وثلاثة أشهر من الحفظ بالتجميد مقارنة بمدة الحفظ بالتبريد لدى المجوعتين A3 و A4 في الوقت الذي انعدمت فيه الفروق المعنوية بين الشهرين الأول والثاني والثاني والثالث لدى المجوعة A4 وبين الأشهر الثلاثة لدى المجموعة A3 (جدول 2). وانخفضت النسبة المئوية للنطف الحية لدى المجوعة A6 بعد مرور 48 ساعة من الحفظ بالتجميد 61.96 ± 1.42% مقارنةً بالحفظ بالتبريد (69.49 ± 1.36%)، كما انخفضت هذه النسبة معنوياً ($P\leq0.01$) بعد مرور ثلاثة أشهر من الحفظ بالتجميد مقارنة بالتبريد، مع عدم اختلاف النسبة ضمن الشهرين الأول والثاني والثاني والثالث (جدول 2). ومن جانب آخر، انخفضت النسبة المئوية للنطف الحية معنوياً ($P\leq0.01$) بعد مدد الحفظ المختلفة قيد الدراسة مقارنة بالحفظ بالتبريد لدى المجموعتين A7 و A8 ، مع عدم اختلاف مدد الحفظ بالتجميد جميعها فيما بينها معنوياً لدى المجموعة A7 وعند مدد الحفظ شهر وشهرين وثلاثة أشهر لدى المجموعة A8 (جدول2).

جدول (2) تأثير إضافة المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل وبعض مضادات الأكسدة الأخرى وخليطهم إلى مخفف الحليب في النسبة المئوية للنطف الحية لدى ثيران الهولشتاين بعد مدد مختلفة من الحفظ بالتبريد والتجميد (المتوسط ± الخطأ القياسي).

المجموعة	المدة										مستوى المعنوية
	بعد التبريد 5°م		بعد 48 ساعة		بعد شهر		بعد شهرين		بعد ثلاث شهور		
A1	$^{A\ cd}$ 62.85	± 3.31	$^{AB\ c}$ 54.66	± 2.49	^{Babc} 51.92	± 3.55	$^{B\ bc}$ 47.50	± 3.82	$^{B\ c}$ 45.82	± 3.38	P ≤ 0.01
A2	$^{A\ a}$ 75.69	± 1.98	$^{A\ a}$ 71.18	± 2.33	$^{A\ a}$ 69.65	± 2.48	$^{A\ a}$ 67.86	± 2.68	$^{A\ a}$ 66.85	± 3.14	N.S
A3	$^{A\ d}$ 57.50	± 3.45	$^{AB\ c}$ 52.55	± 3.52	$^{BC\ d}$ 45.05	± 2.28	$^{C\ c}$ 42.96	± 2.09	$^{C\ bc}$ 41.19	± 1.14	P ≤ 0.01
A4	$^{A\ bc}$ 66.90	± 1.87	^{ABb} 62.00	± 1.76	$^{BC\ b}$ 58.66	± 2.99	$^{CD\ b}$ 53.87	± 2.53	$^{D\ bc}$ 51.06	± 2.24	P ≤ 0.01
A5	$^{A\ ab}$ 73.09	± 1.97	$^{A\ a}$ 71.96	± 1.97	$^{A\ a}$ 70.82	± 2.70	$^{A\ a}$ 68.74	± 2.81	$^{A\ a}$ 68.05	± 3.10	N.S
A6	$^{A\ ab}$ 69.49	± 1.36	$^{B\ b}$ 61.96	± 1.42	$^{C\ bc}$ 56.06	± 1.77	$^{CD\ b}$ 51.65	± 2.39	$^{D\ b}$ 48.05	± 2.85	P ≤ 0.01
A7	$^{A\ d}$ 58.04	± 1.42	$^{B\ c}$ 51.19	± 1.68	$^{BC\ d}$ 47.50	± 1.67	^{BCbc} 46.88	± 1.82	$^{C\ bc}$ 45.46	± 1.07	P ≤ 0.01
A8	$^{A\ d}$ 59.44	± 1.28	$^{B\ c}$ 53.73	± 1.30	$^{C\ cd}$ 49.24	± 0.90	$^{C\ bc}$ 48.31	± 1.54	$^{C\ bc}$ 46.32	± 0.99	P ≤ 0.01
A9	$^{A\ ab}$ 73.09	± 1.97	$^{A\ a}$ 71.96	± 1.97	$^{A\ a}$ 69.39	± 3.26	$^{A\ a}$ 66.97	± 3.36	$^{A\ a}$ 66.62	± 3.43	N.S
A10	$^{A\ a}$ 75.18	± 0.79	$^{A\ a}$ 73.68	± 1.77	$^{A\ a}$ 72.53	± 1.96	$^{A\ a}$ 70.25	± 1.73	$^{A\ a}$ 69.78	± 1.96	N.S
مستوى المعنوية	P ≤ 0.01		P ≤ 0.01		P ≤ 0.01		P ≤ 0.01		P ≤ 0.01		

المتوسطات التي تحمل حروفاً صغيرة ضمن العمود الواحد تشير إلى المقارنة بين المجاميع، والمتوسطات التي تحمل حروفاً كبيرة ضمن السطر الواحد تشير للمقارنة بين المدد المختلفة ضمن المجموعة الواحدة.

N.S: غير معنوية.

المناقشة

كانت النسبة المئوية للمردودية الإنتاجية المتحصل عليها من المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل (*Melissa officinalis*) في الدراسة الحالية (6%) مقاربة للنسبة الطبيعية للمستخلصات للنباتات المختلفة 6-14% (45) اعتماداً على نوع النبات والجزء النباتي المدروس والمذيب المستخدم في عملية الاستخلاص، فقد حصلت (46) على نسبة مئوية للمردودية الإنتاجية للمستخلص المائي لساق نبات الرطراط (*Zygophyllumalbum*) بلغت 7.14%، في حين حصل على نسبة 7.28% في المستخلص الكحولي للنبات نفسه، في الوقت الذي حصل فيه (45) على مردودية إنتاجية للمستخلص الكحولي لأوراق نبات الرطراط بلغت 14.305%، من ناحيةٍ أخرى فأن تركيز المركبات الفينولية الكلية للمستخلص المائي لأوراق حشيشة النحل في الدراسة الحالية (45.527 ± 0.555 ملغم من مكافئ حامض الكاليك/ غم من المستخلص) كان مقارباً لما حصل عليه (47) للمستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل (40.13 ± 2.0- 78.49 ± 3.9 ملغم مكافئ حامض الكاليك/ غم من المستخلص)، أن هذا يؤكد أيضاً ما أشار إليه (13) من احتواء نبات حشيشة النحل على تراكيز عالية من المركبات الفينولية الكلية في دراسة شملت اكثر من 70 نوعاً من النباتات المعروفة بتراكيزها العالية من المركبات الفينولية وقابليتها المضادة للأكسدة، إذ حل نبات حشيشة النحل بالمرتبة الأولى ضمن التصنيف الذي أعدته هذه الدراسة، وهو بذلك يعد ذو فعالية كبيرة كمضاد للأكسدة نظراً لاحتوائه على كميات كبيرة من الفلافونيدات والانثوسيانيدات (14) تفوق تلك الفعالية الخاصة بفيتامين B وC بحوالي عشر مرات (48، 49). أن هذه الخواص لنبات حشيشة النحل، فضلاً عن عدم وجود سمية خلوية لمستخلصه من خلال عدم وجود آثار لتحلل كريات الدم لجميع المستويات التي تم اختبارها قد ساعدت على إمكانية استخدامه بكفاءة عالية في مخففات السائل المنوي في الدراسة الحالية. ان النتائج المتميزة للمجموعة A2 (مخفف الحليب+ 0.031 من المستخلص المائي لأوراق حشيشة النحل) من خلال تحسن كل من النسبة المئوية لحركة النطف الفردية، النطف الحية، لدى ثيران الهولشتاين مقارنةً بمجموعة السيطرة (A1) خلال مدد الحفظ بالتبريد والتجميد المختلفة، قد يعود إلى الفعالية العالية للمستخلص الكحولي لأوراق نبات حشيشة النحل كمضاد طبيعي فعال للأكسدة Powerful antioxidant وكبح نشاط الجذور الحرة التي تتولد بكميات كبيرة خلال مراحل حفظ النطف بالتجميد من خلال احتوائه على تراكيز عالية من المركبات الفينولية وخصوصاً مركب Rosmarinic acid(50). وقد بين (51) في دراسة أجريت لبيان فعالية الفلافونويدات المستخلصة من النباتات كمواد مضادة للأكسدة، ان مجاميع الهيدروكسيل للمركبات الفلافونويدية ذات النشاط المضاد للأكسدة تعد مهمة في عملية كبح نشاط الجذور الحرة المتكونة بفعل الأكسدة الذاتية (Auto-oxidation) للخلية، فضلاً عن خاصيتها كمواد كلابية أو مخلبية (Chelating Agent) مع الفلزات وقدرتها على تثبيط نشاط بعض الإنزيمات (7، 52، 53)، وبالتالي فأن كبح هذه الجذور الحرة يؤدي إلى منع تكوين البيروكسيدات المسببة للتأكسد أو تحطيم الجذور الحرة المتكونة (54). وقد اتفقت نتائجنا بإضافة المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل إلى مخفف الحليب في تحسين النسبة المئوية لحركة النطف الفردية مع ما وجده (55) من تحسن لحركة النطف لدى الرجال عند استخدام بعض المستخلصات النباتية كمضادات للأكسدة لكبح جذور البيروكسيد الحرة بشكل كبير. من جانب آخر، فأن احتواء أوراق نبات حشيشة النحل على نسبة عالية من الفلافونيدات قد يلعب دوراً مهماً في حماية الأغشية الدهنية للنطفة من الأكسدة من خلال كسر سلسلة تفاعل الأكسدة (56) وهذا ما قد يفسر التفوق الحاصل في النسبة المئوية للنطف الحية لثيران المجموعة A2 في الدراسة الحالية، إن إضافة المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل كمضاد أكسدة طبيعي إلى مخفف

الحليب سواءً لوحده أو مع أنواع مختلفة من مضادات الأكسدة الصناعية ودراسة تأثيره في صفات السائل المنوي لثيران الهولشتاين بعد مدد مختلفة من الحفظ بالتبريد والتجميد لم يتم التطرق لها سابقاً سواء في العراق أو العالم وان الدراسة الحالية هي الأولى في هذا المجال، وقد وجد في الآونة الأخيرة ان إضافة مضادات الأكسدة المختلفة على شكل توليفات (Combinations) تحسن من خصائص النطف لدى الرجال (57، 58) فضلاً عن ذلك فأن هناك مواد أخرى له صفة تآزرية (Synergistic effect)، تعمل على تعزيز عمل أو زيادة تأثير فعل مضادات الأكسدة الأولية، من خلال قابليتها على حجز عدد من الأيونات المعدنية المشجعة لعملية الأكسدة (Metal-chelating compounds)، أو أنها تقوم بإعادة تنشيط المواد المضادة للأكسدة (59)، قد يرجع التحسن المعنوي ($P\leq0.01$) الواضح لمعظم صفات السائل المنوي لثيران الهولشتاين لدى المجموعتين A5 (مخفف الحليب+ 0.031 ملي مول من المستخلص المائي لأوراق حشيشة النحل+ 100 وحدة دولية أنزيم الكاتليز) وA10 (مخفف الحليب+ 0.031 ملي مول من المستخلص المائي لأوراق حشيشة النحل+ 0.2 ملي مول فيتامين E) إذ يعمل إنزيم الكاتليز كمانع للأكسدة وكونه الخط الدفاعي الأول في الخلايا ضد أنواع الأوكسجين التفاعلي والجذور الحرة (60)، إذ أن 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^-) (61، 62، 63، 64)، من ناحية أخرى وجد ان فعالية أن 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 (65)، من ناحيةٍ أخرى يعد فيتامين E من المركبات الذائبة في الدهن (66)، كما ونعتقد أن خليط مركبين أو استخدام خلط بين نوعين من مضادات الأكسدة في كل معاملة قد يوفر خطين للدفاع والمحافظة على صفات النطف بعد التجميد (22، 23، 29، 30، 31، 32، 33). ويعمل فيتامين E كمانع أكسدة للأحماض الدهنية غير المشبعة من خلال مقدرته على كبح الجذور الحرة بشكل كفوء جدا والتي تشترك في عملية أكسدة الدهون، لذا يعد فيتامين E من أكثر مانعات التأكسد غير الأنزيمية الفعالة (67) التي تعمل على حماية الكولسترول والأحماض الدهنية (68، 69). كان لإضافة فيتامين E بتركيز 0.02 ملي مول إلى مخفف الحليب (A9) تأثيراً واضحاً ($P\leq0.01$) في تحسين صفتي السائل المنوي المدروسة خلال مدد مختلفة من الحفظ بالتجميد والمتمثلةً بزيادة النسبة المئوية لحركة النطف الفردية بعد ثلاثة اشهر من الحفظ بالتجميد والنسبة المئوية للنطف الحية طيلة مدد الحفظ المختلفة، ان هذا التفوق ربما يعود إلى أن فيتامين E يعد كمضاد أكسدة يعمل على حماية الكولسترول والأحماض الدهنية غير المشبعة في الأغشية الخلوية ومنها غشاء النطفة، إذ يقوم بعملية كسر سلسلة تفاعلات تكوين الجذور الحرة من خلال كبحه لجذور O_2^- وOH^- وROO^- والجذور الحرة الناتجة من أكسدة الدهون (الهيدروبيركسيدات) مؤدياً إلى توليد جذور أخرى عن طريق منحه ذرة هيدروجين لإنتاج مركبات أكثر ثباتا وبالتالي العمل على توقف سلسلة تفاعل وتضاعف الجذور الحرة وبتالي التقليل من أضرار هذه الجذور وتحسن في صفات السائل المنوي للثيران (68، 69)، وقد اتفقت نتائجنا الحالية مع ما شار إليه (70) من إن إضافة فيتامين E إلى مخفف الحليب- صفار البيض أدى إلى زيادة عالية المعنوية في النسبة المئوية لحركة النطف الفردية لدى الثيران مقارنةً بمجموعة السيطرة (44.80±0.22 مقابل 38.70±0.23%)، كان لإضافة مركب Trolox (0.08 ملي مول) في المجموعة A8 عدم ظهور تحسن معنوي في النسبة المئوية لحركة النطف الفردية، يعد مركب Trolox الشبيه الصناعي (Analogue) لفيتامين E القادر على الذوبان في الماء، وهو مضاد جيد للأكسدة ويستخدم في التطبيقات البيولوجية أو البيوكيميائية للحد من الإجهاد التأكسدي أو الضرر، كما يستخدم عادة كمعيار لتحكم الإيجابي في المقاييس المضادة للأكسدة (71، 72، 73)، ولم تتفق نتائجنا الحالية مع ما جاء به كل من (71، 74) الذين

وجدوا تحسناً ملحوظاً في النسبة المئوية لحركة النطف الفردية لدى الرجال، كما لم تتفق النتائج الحالية مع ما توصل إليه (75) لدى الكباش و(72، 76) لدى الخنازير، ان سبب عدم الاتفاق ربما قد يعود إلى اختلاف التراكيز المستخدمة في الدراسات السابقة مقارنة بدراستنا الحالية أو قد يرجع إلى اختلاف عمليات التبريد والحفظ بالتجميد والإسالة ما بين الدراسات المختلفة. من جانب آخر، كان لإضافة فيتامين C بتركيز 5 ملي مول إلى مخفف الحليب (المجموعة A7) لدى نطف ثيران الهولشتاين، عدم تحسن الصفات الأخرى، ولم تتفق نتائجنا الحالية مع ما أشار إليه (70) الذين وجدوا إن إضافة 5 مليمول/ مل من فيتامين C إلى مخفف الحليب– صفار البيض أدى إلى تحسن عالي المعنوية ($P\leq0.01$) في النسبة المئوية لحركة النطف الفردية مقارنةً بمجموعة السيطرة عند حفظه بدرجة حرارة 4– 7م° ولمدة 96 ساعة مقارنةً بمجموعة السيطرة (42.70± 0.22 مقابل 38.70 ± 0.23%)، ان احد أسباب عدم تميز نتائج المجموعة A7 وتدهورها في كثير من صفات السائل المنوي قد يعود للطبيعة الحامضية لفيتامين C وعلاقته مع طبيعة بروتينات الحليب (بروتين الكازين على وجه الخصوص) والتي تسبب تجلطها وبالتالي عدم الاستفادة من دوره كمضاد قوي للأكسدة، إذ بينت نتائج نشاط فعالية مضادات الأكسدة تسجيل المجموعة A7 لنشاطاً جيداً لمضادات الأكسدة. كان لإضافة إنزيم الكاتليز بتركيز 100 وحدة دولية/ مل إلى مخفف الحليب (A6) لنطف ثيران الهولشتاين أثراً في حدوث تحسن معنوي واضح في النسبة المئوية لكل من الحركة الفردية للنطف والنطف الحية مقارنة بمجموعة السيطرة، أن سبب تميز نتائج المجموعة A6 ربما يعود إلى دور إنزيم الكاتليز كمانع للأكسدة وكونه الخط الدفاعي الأول في الخلايا ضد أنواع الأوكسجين التفاعلي والجذور الحرة (60). يمكن الاستنتاج بأن إضافة المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل لوحده أو مع أنواع أخرى من مضادات الأكسدة الصناعية إلى مخفف الحليب كان له دور فعال في تحسين النسبة المئوية لحركة النطف الفردية والحية لثيران الهولشتاين بعد حفظها لمدد زمنية مختلفة من التبريد والتجميد في تحسين معدل الحمل للأبقار الملقحة لمعظم المجاميع المعاملة وبالتالي زيادة نسبة الولادات وزيادة العائد الاقتصادي لمربي الأبقار في العراق.

المصادر

1. Abavisani, A.; Arshami, J.; Naserian, A. A.; Kandelousi, M. A. S. & Azizzadeh, M. (2013). Quality of bovine chilled or frozen- thawed semen after addition of omega-3 fatty acids supplementation to extender. Int. J. Fertil. Steril., 7(3): 161-168.
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(8): 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(4): 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(2): 134- 138.
5. Crespilho, A. M.; Nichi, M.; Guasti, P. N.; Freitas-Dell'Aqua, C. P.; SaFilho, M. F.; Maziero, R. R.; Dell' aqua, J. A. Jr. & 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(3-4): 126-133.
6. Bilodeau, J. F.; Chatterjee, S.; Sirard, M. A. & Gagnon, C. (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. Mol. Reprod. Dev., 55(3): 282-288.

7. Maestri, D. M.; Nepote, V.; Lamarque, A. L. & Zygadlo, J. A. (2006). Natural products as antioxidants. Phytochemistry: Advances in Research. F. Imperato (Ed.), Chapter 5, Research Signpost Publisher, PP. 105-135.
8. Jayachitra, A. & Krithiga, N. (2012). Study on antioxidant property in selected medicinal plant extracts. Int. J. Med. Arom. Plants, 2(3): 495-500.
9. Diculescu, V. C.; Satana, H. E.; Gil, E. D & Brett, A. M. O. (2012). Methoxylation and glycosylation effect on the redox mechanism of citroflavones. Electroanalysis, 24(5): 1019- 1026.
10. Devasagayam, T. P.; Tilak, J. C.; Boloor, K. K.; Sane, K. S.; Ghaskadbi, S. S. & Lele, R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. J. Assoc. Physicians. India, 52: 794-804.
11. Khalaf, N. A.; Shakya, A. K.; Al-Othman, A.; El-Agbar, Z. & Farah, H. (2008). Antioxidant activity of some common plants. Turk. J. Biol., 32: 51-55.
12. Al-Kawry, T. A. & Al-Maktari, G. A. (2011). Evaluation of antioxidant activity of some natural extracts and propyl gallate in refined palm oil. DJAS, 1 (27): 213-228.
13. Katalinic, V.; Milos, M.; Kulisic, T. & Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Food Chem., 94: 550-557.
14. Nascimento, G. G. F.; Locatelli, J.; Freitas, P. C. & Silva, G. L. (2002). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on Antibiotic-resistant bacteria. Braz. J. Microbiol., 31:247-256.
15. المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية اختبار تجريبي لمستخرج من أوراق المليسة المخزنية، تاريخ الولوج:4- نوفمبر 2012.
16. نظام المعلومات التصنيفية المتكامل جنس المليسة تاريخ الولوج 4 نوفمبر 2012.
17. Balasubramaniam, R.; Kuperstein, A. S. & Stoopler, E. T. (2014). Update on oral herpes virus infections. Dent. Clin. North Am., 58 (2): 265-280.
18. 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.
19. Hu, J. H.; Tian, 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(1-2): 72-77.
20. Beconi, M. T.; Francia, C. R.; Mora, N.G. & Affranchino, M. A. (1993). Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. Theriogenology 40(4): 841-851.
21. Asadpour, R.; Jafafri, R. & Tayefi- Nasrabadi, H. (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(1): 37-44.
22. الزيدي، عمر حسين عباس. (2014). إضافة بعض مضادات الأكسدة والاوميكا 3 إلى مخفف Tris وأثرها في تحسين صفات السائل المنوي بعد الحفظ بالتجميد لثيران الهولشتاين. رسالة ماجستير، كلية الزراعة- جامعة بغداد.
23. 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.
24. Surai, P.; Kostjuk, I.; Wishart, G.; Macpherson, A.; Speake, B.; Noble, R.; Lonov, I. & Kutz, E. (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(1-3): 119-132.
25. Akiyama, M. (1990). In vivo scavenging effect of ethylcysteine on reactive oxygen species in human semen. Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi, 90(3):421-428.

26. 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.
27. Ari, U. Ç.; Kulaksiz, R. & Öztürkler, Y. (2011). Freezability of Tushin ram semen extended with goat or cow milk based extenders. Reprod. Domest. Anim., 46(6): 975-979.
28. Paulenz, H.; Söderquist, L.; Adnøy, T.; Fossen, O. H. & Berg, K. A. (2003). Effect of milk- and TRIS-based extenders on the fertility of sheep inseminated vaginally once or twice with liquid semen. Theriogenology, 60 (4):759-766.
29. الناصري، عمر عادل محمد. (2013). إضافة بعض الأحماض الأمينة وتوليفاتها إلى مخفف Tris وأثرها في تحسين بعض صفات السائل المنوي المجمد لثيران الهولشتاين في العراق. رسالة ماجستير، كلية الزراعة- جامعة بغداد.
30. 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 البيطرية، 10 (1): 1- 9.
31. عبدالكريم، 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(1): 8-18.
32. عيدان، ساجدة مهدي، الزيدي، عمر حسين عباس، 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 لثيران الهولشتاين بعد مدد مختلفة من الحفظ بالتجميد. المجلة الطبية البيطرية العراقية، 39 (2): 19- 24.
33. 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. MSc Thesis, College of Agriculture, University of Baghdad.
34. Duh, P. D. & Yen, G. C. (1997). Antioxidative activity of three herbal water extracts. Food Chem., 60 (4): 639-645.
35. Boukri, N. H. (2014). Contribution a'1'etude phytochimique des extraits bruts des epices contenus dans 1 e mélange Ras-e1-hanout. Theme Master Academique. Universite Kasdi Merbah Ouargla, Algeria. P.99.
36. Donaldson, K.; Stone, V.; Tran, C.; Kreyling, W. & Borm, P. (2004). Nanotoxicology. Occup. Envirn. Med., 61(9): 727-728.
37. Singleton, V. L. & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Viticult., 16: 144-158.
38. Chavan, Y. and Singhal, R. S. (2013). Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactives from arecanut (*Areca catechu* L.) and optimization study using response surface methodology. Innov. Food Sci. Emerg. Technol., 17: 106-113.
39. Walton, A. (1933). Technique of artificial insemination. Mp. Bur. Anim. Genet. Iiius-Edinburgh. P. 56.
40. 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.
41. Hancock, J. L. (1952). The morphology of bull spermatozoa. J. Exp. Biol., 29: 445-453.

42. Swanson, E. W. & Beardon, H. J. (1951). An eosin- nigrosin stain differentiating live and dead bovine spermatozoa. J. Anim. Sci., 10(4): 981-987.
43. SAS. (2012). SAS/STAT User's Guide for Personal Computers. Release 9.1 SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA.
44. Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F. Tests. Biometrics. 11: 1-42.
45. Benhammou, N. (2012). Activité antioxydante des extraits des composes phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thése doctorat. Université Aboubakr Belkaïd. Tlemcen. P.174.
46. شمسة، بسمة. (2015). دراسة مقارنة للمردودية والنشاطية المضادة للأكسدة في المستخلص الكحولي والمائي عند نبات (*Zygophyllum album* L). رسالة ماجستير، كلية علوم الطبيعة والحياة– جامعة الشهيد حمه لخضر الوادي. الجزائر.
47. Kasparavičienė, G.; Jurgelevič, J.; Kalvėnienė, Z.; Velžienė, S.; Savickas, A. & Kazlauskienė, D. (2017). Evaluation of extraction factors influence on total phenolic content and antioxidant activity of *Melissa officinalis L*. leaves extracts. CHEMIJA, 28(1): 58-63.
48. Dastmalchi, K.; Damien Dorman, H. J.; Oinonen, P. P.; Darwis, Y.; Laakso, I. & Hiltunen, R. (2008). Chemical composition and *in vitro* antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. LWT-Food Sci. Technol., 41(3): 391-400.
49. Ghayour, N.; Morteza, B. R.; Majid, A.; Tehranipour, M. & Ghayour, M. B. (2010). The protective effects of Melissa officinalis leaves usage on learning disorder induced by lead acetate administration during pre and postnatal periods in rats. AMUJ., 13 (1): 97-104.
50. Rostami, S.; Momeni, Z.; Behnam-Rasouli, M. & Ghayour, N. (2010). Comparison of antioxidant effect of *Melissa officinalis* leaf and vitamin C in lead acetate- induced learning deficits in rat. Daneshvar Med., 17(86): 47- 54.
51. Yokozawa, T.; Chen, C. P.; Dong, E.; Tanaka, T.; Nonaka, G. & Nishioka, I. (1998). Study inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1, 1-diphenyl -2 picrylhdrazyl radical. Biochem. Pharmacol., 56(2): 213-222.
52. Löliger, J. (1991). The use of antioxidants in food. In: Free Radicals and Food Additives (Aruoma, O. I. & Halliwell, B. ed.), Taylor & Francis, London, P. 121
53. Van Acker, S. A. B. E.; Van Balen, G. P.; Van den Berg, D. J.; Bast, A. & Van der Vijgh, W. J. F. (1998). Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. Biochem. Pharmacol., 56(8): 945-943.
54. Sarica, S.; Corduk, M.; Suicmez, M.; Cedden, F.; Yildirim, M. & Kilinc, K. (2007). The effects of dietary L- carnitine supplementation on semen traits, reproductive parameters, and testicular histology of Japanese quail breeders. J. Appl. Poult. Res., 16: 178- 186.
55. Chauhan, N. S.; Sharma, V.; Dixit, V. K. & Thakur, M. (2014). A review on plants used for improvement of sexual performance and virility. Biomed. Res. Int., 2014:868062.
56. Choi, E. M. & Hwang, J. K. (2005). Effect of some medicinal plants on plasma antioxidant system and lipid levels in rats. Phytother. Res., 19(5): 382-386.
57. Greco, E.; Iacobelli, M.; Rienzi, L.; Ubaldi, F.; Ferrero, S. & Tesarik, J. (2005). Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. J. Androl., 26(3): 349-353.
58. Safarinejad, M. R. & Safarinejad, S. (2009). Efficacy of selenium and/or N-acetyl-cysteine for improving semen parameters in infertile men: a double-blind, placebo controlled, randomized study. J. Urol., 181(2):741-751.
59. Owen, R. F. (1976). Principles of Food Science Part 1: Food Chemistry, Marcel Dekker, New York.
60. Caballero, B. M. D. (2007). Antioxidant Nutrients. PhD Thesis. Johns Hopkins University, USA.

61. Auclair, C.; Cramer, E.; Hakim, J. & Boivin, P. (1976). Studies on the mechanism of NADPH oxidation by the granule fraction isolated from human resting polymorphonuclear blood cells. Biochem., 58(11-12): 1359- 1366.
62. Martin, D. W.; Mayes, P. A. & Rodweel, V. W. (1983). Harper's Review of Biochemistry. 18th ed., Lang Medical Publications. Lebanon. P. 128.
63. Wozniak, A.; Drewa, G.; Wozniak, B. & Schachtschabel, D. O. (2004). Activity of antioxidant enzymes and concentration of lipid peroxidation products in selected tissues of mice of different ages, both healthy and melanoma-bearing. Z. Gerontol. Geriatr., 37(3): 184-189.
64. Agarwal, A.; Prabakaran, S. A. & Said, T. M. (2005). Prevention of oxidative stress injury to sperm. J. Androl., 26(6): 654- 660.
65. Sicherle, C. C.; Maia, 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(2-3): 144-149.
66. Traber, M. G. (1999). Utilization of vitamin E. Biofactors, 10(2-3): 115-120.
67. Navarro, F.; Navas, P.; Burgess, J. R.; Bello, R. I.; De Cabo, R.; Arroyo, A. & Villalba, J. M. (1998). Vitamin E and selenium deficiency induces expression of the ubiquinone-dependent antioxidant system at the plasma membrane. FASEB. J., 12(15): 1665- 1673.
68. Burton, G. W.; Joyce, A. & Ingold, K. U. (1982). First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. Lancet., 2(8293): 327.
69. Wayner, D. D.; Lngold, G. W. and Barely, K.U. (1987). The relative contributions of vitamin E, urate, as corbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. Biochim. Biophys. Acta., 924: 408-419.
70. Rania, V. S.; Gupta, A. K. & Singh, K. (2002). Effect of antioxidant fortification on preservability of buffalo semen. Asian- Aust. J. Anim. Sci.,15(1): 16-18.
71. Minaei, M. B.; Barbarestani, M.; Nekoonam, S.; Abdolvahabi, M. A.; Takzare, N.; Asadi, M. H.; Hedayatpour, A. & Amidi, F. (2012). Effect of Trolox addition to cryopreservation media on human sperm motility. Iran. J. Reprod. Med., 10(2): 99-104.
72. Varo-Ghiuru, F.; Miclea, I.; Hettig, A.; Ladoşi, I.; Miclea, V.; Egerszegi, I. & Zăhan, M. (2015). Lutein, Trolox, ascorbic acid and combination of Trolox with ascorbic acid can improve boar semen quality during cryopreservation. Cryo. Letters, 36(1): 1-7.
73. Nekoonam, S.; Nashtaei, M. S.; Naji, M.; Zangi, B. M. & Amidi, F. (2016). Effect of Trolox on sperm quality in normozospermia and oligozospermia during cryopreservation. Cryobiology, 72(2): 106-111.
74. Taylor, K.; Roberts, P.; Sanders, K. & Burton, P. (2009). Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. Reprod. Biomed. Online, 18(2): 184-189.
75. Silva, E. C.; Cajueiro, J. F.; Silva, S. V.; Soares, P. C. & Guerra, M. M. (2012). Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. Theriogenology. 77(8): 1722- 1726.
76. Pena, F. J.; Johannisson, A.; Wallgren, M. & Rodriguez Martinez, H. (2003). Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. Anim. Reprod. Sci., 78(1-2): 85- 98.