تاثير إضافة بعض مضادات الأكسدة الانزيمية وغير الانزيمية إلى مخفف Tris في قابلية التجميد لدى ثيران الهولشتاين بعد مدد مختلفة من الحفظ بالتجميد

عيدان، ساجدة مهدي [1] و الزيدي، عمر حسين [1] و إبراهيم ، فارس فيصل[2] و التميمي، باسمة عبد رجب [2] ولطيف ، وفاء يدام[2]

[1] قسم الثروة الحيوانية، كلية الزراعة، جامعة بغداد، [2] قسم التلقيح الاصطناعي، دائرة الثروة الحيوانية، وزارة الزراعة، العراق.

E-mail: dr_staaa@yahoo.com

مقبول للنشر في: 2015/2/17

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة بهدف بيان تأثير إضافة بعض مضادات الأكسدة الانزيمية (الكاتليز) والكلوتاثيون المختزل وخليطهما إلى مخفف Tris في قابلية التجميد لثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد لمدد مختلفة. استعمل في هذه الدراسة سبعة ثيران هولشتاين بأعمار تتراوح بين 2.5–3 سنة. جمع السائل المنوي بوساطة المهبل الاصطناعي بواقع قذفة واحدة/ثور/اسبوع. جُمع السائل المنوي الطازج للثيران جميعها (Pooled semen) وقُسمَ بالتساوي على المعاملات المختلفة وبإستعمال مخفف Tris. عدت المعاملة الأولى كمجموعة سيطرة في حين أضيف انزيم الكاتليز للمعاملة الثانية والكلوتاثيون المختزل للمعاملة الثالثة بتركيز 100 وحدة دولية/مل و0.2 ملي مول/مل إلى مخفف Tris وعلى التوالي، فضلاً عن توليفتهما وللتراكيز نفسها المذكورة للمركبين للمعاملة الرابعة. أجريت دراسة تاثير هذه الإضافات في قابلية تجميد السائل المنوي خلال مدد حفظ زمنية مختلفة، تجميد بعد 48 ساعة وشهر وشهرين وثلاثة اشهر. أظهرت النتائج أنّ إضافة انزيم الكاتليز إلى مخفف Tris في المعاملة الثانية أدت إلى زيادة معنوية عند مستوى ($P<0.01$) في قابلية التجميد وطيلة مدد الخزن المدروسة مقارنةً بمجموعة السيطرة. كذلك أدّت إضافة الكلوتاثيون المختزل في المعاملة الثالثة إلى زيادة ($P<0.01$) في قابلية التجميد لكافة مدد الحفظ المدروسة مقارنةً بمجموعة السيطرة. كما أدّت إضافة خليط انزيم الكاتليز والكلوتاثيون المختزل في المعاملة الرابعة إلى زيادة عالية المعنوية ($P<0.01$) في النسبة المئوية لقابلية التجميد مقارنةً بمجموعة السيطرة خلال مدد الحفظ بالتجميد المختلفة. نستنتج من هذه الدراسة أنّ إضافة بعض مضادات الأكسدة الانزيمية (الكاتليز) والكلوتاثيون المختزل وخليطهما ادت إلى تحسين قابلية تجميد السائل المنوي لثيران الهولشتاين أوقد يسهم في زيادة نسبة الخصوبة لدى الأبقار ومن ثم زيادة العائد الاقتصادي للمربي.

الكلمات المفتاحية: الكاتليز، الكلوتاثيون المختزل، مخفف Tris، قابلية التجميد، الثيران.

المقدمة

حُفِظ السائل المنوي بالتجميد (Semen cryopreservation) منذ أكثر من نصف قرن لأغراض التلقيح الاصطناعي الذي أصبح واسع الانتشار في العالم (1). وترتبط عملية الحفظ بالتجميد في معظم اللبائن ومنها الثيران بإنتاج أنواع الاوكسجين الفعالة (Reactive oxygen species, ROS) الذي له دور كبير في أكسدة الدهون لأغشية النطفة (Lipid peroxidation, LPO)، فضلاً عن تحطم المادة الوراثية، الامر الذي ينعكس سلبا على انخفاض حركة النطف وحيويتها وقابليتها على التجميد وقابليتها على الاخصاب في الثيران (2-4). كما أن التحرر المستمر لأنواع الاوكسجين الفعالة من النطف المشوهة وغير الناضجة وكذلك الناتج من عمليات تجميد وإسالة السائل المنوي والتي غالباً ما يرافقها انخفاض تركيز مضادات الأكسدة في خلية النطفة والبلازما المنوية وأحداث الاجهاد التأكسدي على النطفة (5).

تحتوي نطف الثيران على كميات قليلة من مضادات الأكسدة الداخلية والمصدر الرئيس لهذه المضادات هي البلازما المنوية (6) التي تحتوي على بعض المضادات الانزيمية مثل Superoxide dismutase وCatalase و Glutathione reductase (GSH) وGlutathione peroxidase (GSH-Px) فضلاً عن كميات قليلة من فيتامين C وE (5 و7). من ناحية أخرى، تحتوي أغشية النطف في اللبائن على كميات كبيرة من الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة (Polyunsaturated fatty acids, PUFA) ذات الأثر المضاد للأكسدة (8)، وهي تؤدي أداءً مهماً في تنظيم سيولة غشاء الخلية وعملية تكوين النطف لدى الرجال والثيران والخيول والخنازير (9 -11).

يعد أنزيم الكاتليز (Catalase) أحد الأنظمة الأنزيمية الدفاعية الموجودة في سايتوبلازم النطفة والبلازما المنوية الذي يؤدي دوراً كبيراً في حماية النطف من ضرر أنواع الأوكسجين الفعالة، أذ يعمل على إزالة او تقليل تراكيز بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) وتحويله إلى اوكسجين وماء (12 و13). وقد لوحظ أن إضافة تراكيز مختلفة من أنزيم الكاتليز إلى مخفف السترات أدت إلى انخفاض تركيز المالون داي الديهايد (Malondialdehyde) في البلازما المنوية وزيادة حركة وحيوية النطف لدى الثيران (14).

في حين وجد ان الكلوتاثيون يوفر وسيلة دفاع خلوية للنطفة ضد الاجهاد التأكسدي خلال عمليات تجميد واسالة السائل المنوي لدى ثيران الجاموس (15)، أذ ينخفض مستواه بشكل واضح خلال عمليات الحفظ بالتجميد (6). وقد أدت إضافة الكلوتاثيون إلى مخفف Tris إلى تحسن حركة النطف وحيويتها وسلامة الغشاء البلازمي والاكروسوم لدى الثيران (15-17)، في حين لم يجد Rastegarnia (18) تأثيرا واضحاً لإضافة الكلوتاثيون على نوعية النطف بعد الحفظ بالتجميد لدى ثيران الجاموس، فضلاً عن ذلك، فإن أي تحسن في خصوبة النطف بعد حفظها بالتجميد يجب أن يرافقها إضافة أنواع مختلفة من مضادات الأكسدة إلى مخففات السائل المنوي (19). كما وجد حديثاً أنّ إضافة هذه المضادات كتوليفات (Combinations) تحسن خصائص النطف لدى الذكور (20 و21). وقد جرت عدة محاولات لإضافة بعض مضادات الأكسدة الأنزيمية وغير الأنزيمية المذكورة آنفاً إلى مخففات السائل المنوي للثيران فردياً الا ان نتائجها كانت متباينة في تحديد افضل نوع ومستوى لها يحقق أفضل خصائص للنطف بعد الحفظ بالتجميد. ولم تتطرق إلى استعمال توليفات مختلفة من مضادات الأكسدة الأنزيمية لدى الثيران وإن دراستنا الحالية تعد الأولى على مستوى العالم في

هذا المجال، وبناءً على ما تقدم، فقد أجريت هذه الدراسة لمعرفة تاثير إضافة مضادات الأكسدة الأنزيمية مثل أنزيم الكاتليز والكلوتاثيون وخليطهما إلى مخفف Tris في قابلية التجميد لدى ثيران الهولشتاين بعد حفظه بالتجميد لمدد مختلفة.

المواد وطرائق العمل

أجريت هذه الدراسة في مركز التلقيح الاصطناعي التابع لدائرة خدمات الثروة الحيوانية في منطقة ابي غريب/وزارة الزراعة (25 كم غرب بغداد) للمدة من تشرين الاول 2012 وحتى آيار2013. استعمل في هذه التجربة سبع ثيران هولشتاين ومدربة على جمع السائل المنوي بطريقة المهبل الاصطناعي تراوحت اعمارها بين 2.5-3 سنوات وبوزن جسم يتراوح 500-750 كغم/ثور. كانت جميع الثيران بصحة جيدة وخالية من الأمراض وخاضعة للإشراف البيطري. وخضعت جميع الحيوانات لنظام غذائي موحد بعليقة مركزة بمقدار 4 كغم علف مركز/حيوان وبنسبة بروتين خام 18% وطاقة 3323 كيلوسعرة كغم فضلاً عن دريس الجت بكمية تتراوح بين 7-9 كغم/حيوان/يومياً والعلف الاخضر بواقع 50- 60 كغم/حيوان/يومياً. كما استعمل الماء الصالح للشرب طيلة مدة التجربة.

جُمِعَ السائل المنوي من الثيران بوساطة المهبل الاصطناعي (Artificial Vaginal) وبواقع 1 قذفة/ ثور/ أسبوع، وبلغ عدد القذفات التي جمعت في مدة التجربتين 98 قذفة وبمعدل 14 قذفة/ثور للتجربة الواحدة. أُخِذَ 1 مل من السائل المنوي/ثور لعمل تجميع السائل المنوي pooled (semen) لغرض ازالة الفروق الفردية بين الثيران، أجريت الفحوصات اللازمة لتقييم السائل المنوي الطازج (حجم والاس الهيدروجين PH وتركيز النطف في القذفة، والحركة الجماعية والحركة الفردية) ومن ثم تقسيمه بالتساوي على المعاملات المختلفة في التجربة الواحدة باستخدام مخفف Tris المعد سابقاً. جُمع السائل المنوي للثيران جميعها، وقد قُسِّم على أربع مجاميع بعد تخفيفه بمخففات Tris. عُدّت المجموعة الأولى مجموعة سيطرة (B1) والتي لم تُضَف فيها أي مادة إلى مخفف Tris الحاوي على السائل المنوي. في حين أضيف 100 وحدة دولية من انزيم الكاتليز (Catalase, SIGMA-ALDRICH, USA) إلى مخفف Tris لدى المعاملة الثانية (B2). أما المعاملة الثالثة (B3) فقد أضيف0.2 مليمول من الكلوتاثيون (Glutathione (reduced), SCHUCHARDT MUNCHEN, Germany) إلى مخفف Tris. في حين أضيف خليط من انزيم الكا تليز والكلوتاثيون إلى مخفف Tris في المعاملة الرابعة (B4) وبالتراكيز نفسها في المعاملة الثانية والثالثة. وقد أستمرت عمليات الجمع مدة سبعة أسابيع وبواقع قذفة/اسبوع وبمعدل 49 قذفة للتجربة. وأُجريت فحوصات السائل المنوي لكل معاملة عند التبريد والتجميد 48 ساعة والشهر الاول والثاني والثالث من الحفظ بالتجميد والتي سيتم التطرق لها لأحقاً بشي من التفصيل. وقد حُضّر مخفف Tris حسب طريقة Salamon و Maxwell (22). وقُدّرت قابلية التجميد وفقا لطريقة Patt وNath (23) للوقوف على صفة من صفات السائل المنوي بعد الحفظ بالتجميد وهي قابليتها على المحافظة على خصائصه الفسلجية وحُسِبت كما في المعادلة الآتية:

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

استعمل البرنامج SAS (24) في التحليل الإحصائي وفق التصميم العشوائي الكامل (CRD) لدراسة تأثير العوامل المختلفة في الصفة المدروسة وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار Duncan (25) متعدد الحدود. كما استعمل البرنامج SAS (2010) في التحليل الإحصائي على وفق النماذج الرياضية الاتية. الانموذج الرياضي الأول: للتحري عن تأثيرات المعاملات المدروسة في قابلية التجميد ولكل وقت.

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

إذ إن:

Yij: قيمة المشاهدة العائدة للمعاملة i.
μ: المتوسط العام للصفة.
T_{ij}: تأثير المعامل i.
Ti: تباين المعاملة.
eij: الخطأ العشوائي الذي يتوزع توزيعاً طبيعياً بمتوسط يساوي صفر وتباين قدره $б e^2$.

الانموذج الرياضي الثاني: للتحري عن تأثير الاوقات المدروسة ولكل معاملة.

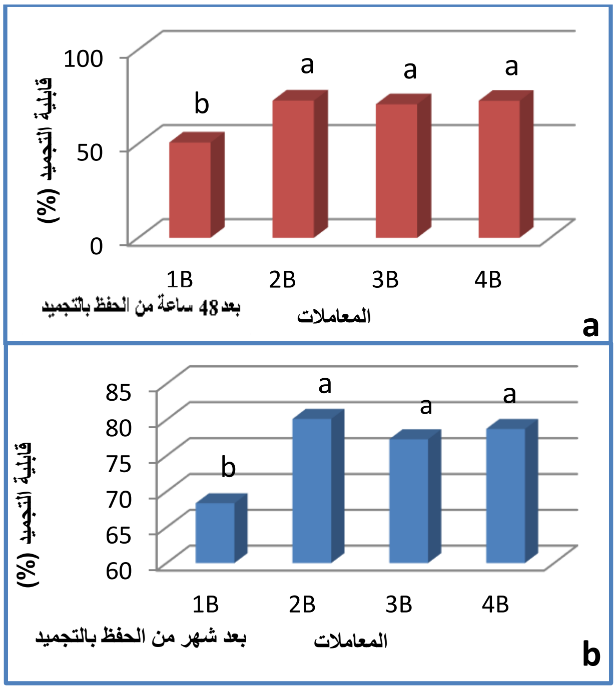
$$Yij = \mu + Pi + eij$$

إذ إن:

Yij: قيمة المشاهدة j العائدة للمعاملة i.
μ: المتوسط العام للصفة.
Pi: تأثير أوقات المختلفة من التجميد.
Ti: تباين المعاملة.
e_{ij}: الخطأ العشوائي الذي يتوزع توزيعاً طبيعياً بمتوسط يساوي صفر وتباين قدره $б e^2$.

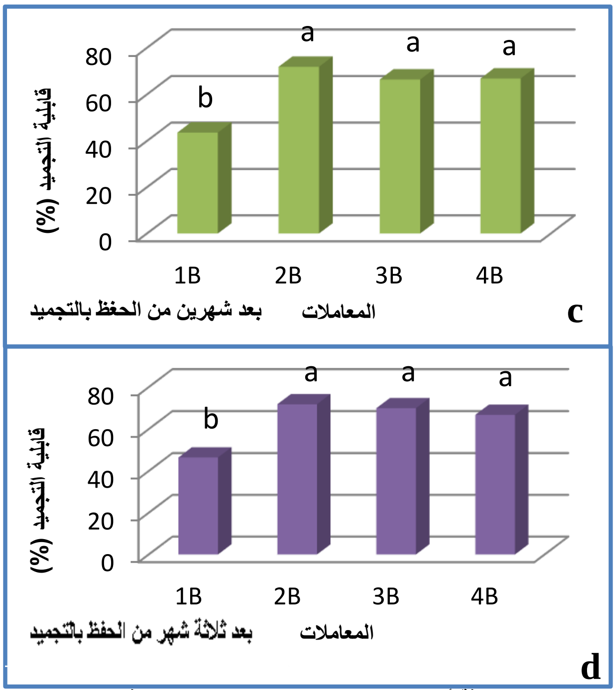
النتائج والمناقشة

أدت المعاملات المختلفة إلى زيادة قابلية تجميد النطف ازدياداً عالي المعنوية (P<0.01) خلال جميع المراحل التجربة (48 ساعة والشهر الاول والثاني والثالث من الحفظ بالتجميد) (شكل، 1 و 2). وقد سجلت المعاملة 100 وحدة دولية من أنزيم الكاتليز (B2) أعلى قابلية تجميد خلال جميع مدد الحفظ تلتها المعاملة B4 (شكل،1 و2 وجدول، 1). أوضحت النتائج (جدول، 1) وجود فروق معنوية (P<0.01 وP<0.05) بين مدد الحفظ بالتجميد المختلفة للمعاملات الأربعة قيد الدراسة مع وجود انخفاض حسابي واضح لهذه الصفة بعد الشهر الثالث من الحفظ بالتجميد في المعاملة B1(43.58 ± 5.12 %) وكذلك تفوق مدة 48 ساعة من الحفظ بالتجميد على بقية مدد الحفظ بالتجميد ضمن المعاملات B1 وB2. وإنّ سبب تفوق المعاملة المضاف لها الكاتليز (B2) ربما يعود إلى أثر انزيم الكاتليز كمانع للأكسدة وكونه الخط الدفاعي الاول في الخلايا ضد أنواع الاوكسجين التفاعلي والجذور الحرة (26)، إذ إن جزيئة واحدة من أنزيم الكاتليز لها القدرة على تفكيك 2 مليون جزيئة من H_2O_2 في الدقيقة الواحدة فضلاً عن دوره في الحد من نشاط أنزيم NADPH Oxidase مما يقلل من أنتاج جذر O^{-}_2 (27-30). من ناحية أخرى، وجد ان فعالية انزيم الكاتليز تعتمد على فعالية مركب NADPH في الغشاء البلازمي للنطفة إذ يرتبط هذا الانزيم لحماية نفسه من حدوث عدم الفعالية ومن ثم زيادة فعاليته داخل خلية النطف (13).



شكل، 1: تاثير إضافة أنزيم الكاتليز والكلوتاثيون المختزل وخليطهما في مخفف Tris في قابلية التجميد (%) لدى ثيران الهولشتاين بعد 48 ساعة (a). المتوسطات التي تحمل حروفا مختلفة تشير إلى وجود فروق معنوية (P<0.01) بين المعاملات: B1: مجموعة السيطرة (مخفف Tris)، B2: مخفف Tris + 100 وحدة دولية انزيم CAT، B3: مخفف Tris+2 مليمول GSH، B4: مخفف Tris+ 100وحدة دولية انزيم CAT+2 مليمول GSH.

يوجد الكلوتاثيون في السائل المنوي بصورته المختزلة (GSH) بكمية أكبر من صورته المؤكسدة (GSSG) ويعمل على تحفيز عمليات التحلل السكري الهوائي (Aerobic glycolysis) في البربخ وإن دوره في تنظيم الايض يعود لامتلاكه مجموعة الكبريت (31). يلعب الكلوتاثيون دوراً كعامل مساعد لعمل انزيمات (Glutathione peroxidase وGlutathione reductase وGlutahione S-transferas) في نظام الأكسدة والاختزال للكلوتاثيون الموجود في النطف (32). أن سبب تفوق معاملة الكلوتاثيون على مجموعة السيطرة ربما يعود إلى أنّ الكلوتاثيون يعد من المستوى الاول للدفاع ضد تكون الجذور الحرة وأنواع الاوكسجين الفعالة (33)، إذ الاساسية في فعاليته البيولوجية والكيموحيوية) (34 و35). وتتفاعل هذه المجموعة الكبريتية بشكل مباشر مع عدد من الجذور الحرة مثل H_2O_2 وO_2^{-} و*OH وجذور الهيدروبيركسيدات وبذلك يعد الكلوتاثيون المختزل كاسحاً (Scavenger) للجذور الحرة (36-38). أو ربما يعود السبب إلى قابلية الكلوتاثيون المختزل في التأثير على أيض الخلية من خلال إزالة السمية الناتجة عن عمليات أيض النطف (39). أو لدوره في حماية الأغشية الدهنية والبروتينات والأحماض النووية من ضرر جهد الأكسدة في النطف (30). أن سبب تفوق معاملة الخليط (B4) على (B1) ربما يعود إلى توافر مركبين من مستوى الدفاع الاول ضد تكون الجذور الحرة أو تكون أنواع الاوكسجين التفاعلي (33)، أي نوفر حماية كافية من ضرر جهد الأكسدة الناتجة من جراء التبريد والتجميد والإسالة والذي تم ذكره آنفاً لكل من الكاتليز والكلوتاثيون المختزل ومن ثُمَ زيادة قابلية التجميد للسائل المنوي. يمكن الاستنتاج بإمكانية استعمال أنزيم الكاتليز والكلوتاثيون المختزل وخليطهما في تحسين صفات السائل المنوي بعد الحفظ بالتجميد مما ينعكس على زيادة نسبة الخصوبة لدى الابقار الملقحة أصطناعياً. وكذلك توصي هذه الدراسة امكانية استعمال أكثرمن مركب مضاد للأكسدة في تحسين صفات السائل المنوي بعد الحفظ بالتجميد وحسب توفرها في الاسواق المحلية.



شكل، 2: تاثير إضافة أنزيم الكاتليزوالكلوتاثيون المختزل وخليطهما في مخفف Tris قابلية التجميد (%) لدى ثيران الهولشتاين بعد شهرين (c) وثلاثة أشهر (d) من الحفظ بالتجميد. المتوسطات التي تحمل حروفا مختلفة تشير إلى وجود فروق معنوية (P<0.01) بين المعاملات: B1: مجموعة السيطرة (مخفف Tris)، B2: مخفف Tris+100 وحدة دولية انزيم CAT، B3: مخفف Tris+2 مليمول GSH، B4: مخفف Tris+ 100 وحدة دولية انزيم CAT+2 مليمول GSH.

جدول، 1: تاثير إضافة أنزيم الكاتليزوالكلوتاثيون المختزل وخليطهما إلى مخفف Tris في قابلية التجميد (%) لدى ثيران الهولشتاين بعد مدد مختلفة من الحفظ بالتجميد (المتوسط ± الخطأ القياسي).

الفترة / المعاملة	بعد 48 ساعة من الحفظ بالتجميد	بعد الشهر الاول من الحفظ بالتجميد	بعد الشهر الثاني من الحفظ بالتجميد	بعد الشهر الثالث من الحفظ بالتجميد	مستوى المعنوية
B1	2.70±68.36 A b	5.16±50.65 B b	4.94±46.47 B b	5.12±43.58 B b	P < 0.01
B2	1.50±80.11 A a	2.44±72.92 B a	1.70±71.83 B a	1.70±71.83 B a	P < 0.01
B3	2.28±77.29 A a	3.37±70.97 AB a	3.13±69.95 AB a	2.73±66.36 B a	P < 0.01
B4	2.02±78.72 A a	2.93±72.78 AB a	3.25±66.79 B a	3.25±66.79 B a	P < 0.05

المتوسطات التي تحمل حروفا صغيرة ضمن العمود الواحد تشير للمقارنة بين المعاملات (P<0.01)، والمتوسطات التي تحمل حروفا كبيرة ضمن السطر الواحد تشير للمقارنة بين المدد المختلفة ضمن المعاملة الواحدة (P<0.01).

المصادر

1. Calisici, O. (2010). Investigation of antioxidative capacity in bovine seminal plasma: Effects of omega-3 fatty acids. PhD. Thesis, College of Samaun/Türkei.
2. Chatterjee, S. and Gagnon, C. (2001). Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. Mol. Reprod. Dev., 59: 451-458.
3. Sariözkan, S.; Bucak, M. N.; Tuncer, P. B; Uiutas, P. A. and Bilgen, A. (2009). The influence of cystein and taurine on microscopic oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. Cryobiology, 58: 134-138.
4. Crespilho, A. M.; Nichi, M.; Guasti, P. I. V.; Freitas -Dell, C. P.; Safilho, M. F.; Mazlero, R. R.; Dell Aqua, J. A. and 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):126-33.
5. Sikka, S. C. (2004). Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. J. Androl., 25: 5-18.
6. Bilodeau, J. F.; Chatterjee, S.; Sirad, M. A. and 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. Aitken, R. J.; Baker, M. A. and Bryan, M. O. (2004). Shedding light on chemiluminescence the application of chemiluminescence in diagnostic andrology. J. Androl., 25:455-465.
8. Aitken, R. J.; Harkiss, D. and Buckingham, D.W. (1993). Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. Mol. Reprod. Dev., 35: 302–315.
9. Haidl, G. and Opper, C. (1997). Changes in lipids and membrane anisotropy in human spermatozoa during epididymal maturation. Hum. Reprod., 12: 2720-2723.
10. Parks, J. E. and Lynch, D. V. (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. Cryobiology, 29:255–266.
11. Ollero, A.; Powers, R. D. and Alvarez, J. G. (2000).Variation of docosahexaenoic acid content in subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: Implications for sperm lipoperoxidative damage. Mol. Reprod. Dev., 55: 326-334.
12. Aitken, R. J.; Clarkson, J. S. and Fishel, S. (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. Biol. Reprod., 141:183-197.
13. Sicherle, C. C.; Maiab, M. S.; Bicudo, S. D.; Rodella, L. and 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.
14. Asadpour, R.; Jafari, R. and 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.
15. Ansari, M. S.; Rakha, B. A.; Ullah, N.; Andrabi, S. M. H.; Iqbal, S.; Khalid, M. and Akhter, S. (2010). Effect of exogenous glutathione inextenderon the freezability of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. Anim. Sci. Papers. Reports, 28: 235-244.
16. Bilodeau, J. F.; Blanchette, S.; Gagnon, C. and Sirard, M. A. (2001). Thiols prevent H_2O_2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. Theriogenology, 56: 275-286.
17. Gadea, J.; Gumbao, D.; Novas, S. C.; Zquezf, A. Z.; Grullo, L. A. and Gardo, G. C. (2007). Supplementation of the dilutionmedium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen–thawed bull spermatozo. Andrology., 7: 1-10.
18. Rastegarnia, A.; Shetabi, N.; Topraggaleah, T. R. and Nasiri, Y. (2012). Effect of exogenous glutathione supplementation in Bixcell extender on quality cryoperserved buffalo (Bubalus bubalis) semen. J. Anim. Vet. Adv., 11: 3437-3443.
19. Foote, R. H.; Brockett, C. C. and Kaproth, M. T. (2002). Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. Anim. Reprod. Sci., 71: 13-23.
20. Greco, E.; Iacobelli, M.; Rienzi, L., Ubaidi, F., Ferrero, S. and Tesarik, J. (2005). Education of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. J. Androl., 26: 349–353.

21. Safarinejad, M. R.; and Safarinejad, S. (2009). Efficacy of selenium and/or N-acetylcysteine for improving semen parameters in infertile men: A double-blind, placebo controlled, randomized study. J. Urol., 181:741–751.
22. Salamon, S. and Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. Anim. Reprod. Sci., 62: 77-111.
23. Patt, J. A. and Nath. (1969). Effect of diluents equilibaration time and Freezing rates on storage of ram semen. Cryobiology, 5: 385-392.
24. SAS. (2010). SAS/STAT User's Guide for Personal Computers. Release 9.1SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.
25. Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F. Tests. Biometrics. 11: 1-42.
26. Caballero, B. M. D. (2007). Antioxidant Nutrients. PhD Thesis. Johns Hopkins University.
27. Auclair, C., Cramer, E.; Hakim, J. and Boivin, P. (1976). Studies on the mechanism of NADPH oxidation by the granula fraction isolated from human resting polymorpho-nuclear blood cells. Biochem., 58: 1359-1366.
28. Martin, D. W.; Mayes, P. A. and Rodweel, V. W. (1983). Harper's Review of biochemistry. 18th edn-Lang medical publications. Lebanon. Pp: 128.
29. 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.
30. Agarwal, A. and Prabaran, S. A. (2005). Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male productive physiology. Indian J. Exp. Biol., 43: 963-974 .
31. Jain, M. C. and Arora, N. (2003). Comparative study of glutathione concentration of bovine and bubaline sperm head, mid piece and tail. Ind. Vet. J., 80: 628-631.
32. Perumal, P. (2008). Reduced glutathione and cysteine hydrochloride on crossbreed bull semen. PhD Thesis. Faculty of Veterinary Science and Animal Husbandry. University of Agriculture and Technology. India.
33. Surai, P. F. (1999). Vitamin E in avian reproduction. Poultry Avian Biol. Rev., 10: 1- 60.
34. Lands, L. C.; Grey, V. L. and Smountas, A. A. (1999). Effect of supplementation glutathione with cysteine donar on muscular performance. J. Appl. Physiol., 87: 1381-1385.
35. Dickinson, D.; Lu, C. and Forman, H. (2003). Glutathione regulation. Society education program. Soc. Free Rad. Bio. Med., 2: 27-30.
36. Anderson, M. E. and Meister, A. (1983). Glutathione. Ann. Rev. Biochem., 52: 711-760.
37. Bains, J. S. and Shaw, C. A. (1997). Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. Brain. Res. Rev., 25: 335-359.
38. Lenzi, A.; Gandini, L.; Maresca, V.; Rago, R.; Sgro, P.; Dondero, F. and Picardo, M. (2000). Fatty acid composition of spermatozoa and immature germ cells. Molecular Hum. Reprod., 6: 226-231.
39. Dematos, D. G. and Furnus, C. C. (2000). The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of β-mercaptoethanol, cysteine and cystine. Theriogenology, 53: 761-771.

Effect of adding catalase and glutathione reduce to Tris extender on freezing ability of Holstein bulls following different cryopreservation periods

Eidan, S. M.[1]; Al-Zaidi, O. H.[1]; Ibrahim F. F[2]; A l-Timimi, B. A. R.[2] and Lateef, W. Y.[2]

[1] Department of Animal Resources, College of Agriculture, Baghdad University, [2]Department of Artificial Insemination, Directorate of Animal Resources, Ministry of Agriculture, Iraq.

E-mail: dr_staaa@yahoo.com

Summary

This study was conducted to explore the adding effect of enzymatic antioxidants Catalase, and glutathione reduced and their combinations to Tris extender on freezing ability of Holstein bulls for different periods. Seven Holstein bulls of 2.5-3 years old were used in this study. Semen was collected via artificial vagina at once ejaculate/ bull/ week. The fresh semen was pooled and then equally divided for various treatments within each experiment using Tris extender. The first experiment was considered as control group. In the second experiment, catalase was added and in the third experiment, glutathione reduced were added separately with the concentrations of 100 IU and 0.2 mM/ml, respectively and as binary combinations of them using similar singular concentrations in fourth experiment. The effect of these adding on freezing ability of Holstein bulls on different cryopreservation periods after 48 Hrs., 1, 2 and 3 months were studied. The results showed that in the second experiment where Catalase added exhibited highly ($P<0.01$) freezing ability percentage and during all preservation periods in compared with control group. In third experiment, addition of glutathione reduced to Tris extender has improved ($P<0.01$) in freezing ability during the whole preservation periods in comparison with control group. Considerable increasing ($P<0.01$) in freezing ability percentage was observed in fourth experiment following addition the combinations of Catalase, and glutathione reduced to Tris extender during all cryopreservation periods in comparison with control group. In conclusion of this study, the addition of some enzymatic antioxidants Catalase and glutathione reduced and their combinations led to improved freezing ability of Holstein bulls during different cryopreservation periods, or may lead to increase the fertility rate among the cows and then increase the economic return for owners.

Keywords: Catalase, Glutathione reduce, Tris extender, Freeze ability, Bulls.