تأثير اضافة مستويات مختلفة من الكلوتاثيون المختزل الى مخفف السائل المنوي المحفوظ بالتبريد على نسبة النطف الحية وسلامة الغشاء البلازمي والجسيم الطرفي للكباش العواسي

حسام جاسم حسين بنانه [1] حاكم تكليف عبد الخزرجي[2]

استاذ مساعد

[1]كلية الزراعة / جامعة بغداد

[2]وزارة الزراعة / مديرية زراعة النجف الاشرف

المستخلص :

أجريت الدراسة الحالية خلال المدة من شباط 2017 وحتى آذار 2017، بهدف بيان تأثير اضافة مستويات مختلفة من الكلوتاثيون (مضاد أكسدة) الى مخفف السائل المنوي للكباش العواسي وتأثيرها في 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 4 كباش عواسي محلية تتراوح اعمارها (2–4) سنة. جمع السائل المنوي بوساطة المهبل الاصطناعي بواقع قذفة واحدة / كبش /اسبوع، مزج السائل المنوي للكباش (Pooled semen) لإزالة الفروق الفردية بين الكباش واجريت 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، التي تألفت من ثلاث معاملات اضيف اليها وهي:

T1: مجموعة السيطرة (مخفف Tris).

T2: مخفف Tris+ كلوتاثيون (30 ملغم. 100 مل)$^{-1}$

T3: مخفف Tris+ كلوتاثيون (60 ملغم. 100 مل) $^{-1}$.

أشارت النتائج الى ان اضافة الكلوتاثيون المختزل (T3) ادت الى تفوق عالِ المعنوية ($P<0.01$) في صفات (نسبة النطف الحية ونسبة النطف ذات الغشاء البلازمي السليم ونسبة النطف ذات الجسيم الطرفي السليم) في زمن الحفظ 96 ساعة، إذ بلغت (67.50±2.84، 54.50± 2.39 ، 90.25± 0.85%) على التوالي. بينما لم تسجل فروق معنوية بين المعاملات في صفة نسبة النطف ذات الجسيم الطرفي السليم، إذ بلغت للمعاملة (T3) (90.25±0.85 %) وللمعاملة (T2)(89.50±0.64 %)، مقارنة بمعاملة السيطرة.

الكلمات المفتاحية: الكلوتاثيون المختزل، مضادات الاكسدة، خصائص النطف ،التبريد.

البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني.

Effect of adding different concentrations of reduced glutathione to semen extenders stored at 5C° on the percentage of live sperm and integrity of plasma membrane and acorosome of Awassi rams.

Husam J. H. Banana[1] **Hakem T.A. Alkhazreji[2]**
Assistant Professor
[1]University of Baghdad-College of Agriculture
[2]Directorate of Agriculture in Al-Najaf

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 (anti-oxidant) to dilute the semen of the Awassi rams and their effect on semen characteristics after cooling at 5C° for five days, Livestock and laboratories affiliated to the Department of Animal Production / College of Agriculture / University of Baghdad in Jadiriyah.

In this study, four local awassi rams were used, its ages ranging from 2 to 4 years. Semen were collected by artificial vagina at a rate of one ejaculate/ ram /week, then the semen were mixed (Pooled) to remove the individual differences between the rams and tests were conducted to evaluate the characteristics of fresh semen before the dilution which include color, viscosity, pH, mass motility, individual motility, sperm concentration and the percentage of viable and abnormal sperms. The samples were divided equally on the experimental treatments using TRIS extender and a 1: 10 dilution ratio, which consisted of 3 treatments that's contain glutathione as follows:

T1: control group (Tris diluted).
T2: Tris dilute + glutathione (30 mg /100 ml).
T3: Tris dilute + glutathione (60 mg / 100 ml).

The results indicated that the addition of reduced glutathione (T3) resulted in a high significant ($P < 0.01$) in the characteristics of (the percentage of live sperm, and the ratio of sperm with the plasma membrane integrity at time 96 hours. It was (67.50±2.84, 25.75±0.67, 54.50± 2.39%) respectively. No significant differences were recorded between the treatments in the percentage of sperm with acrosome itegrity. The treatment was (T3) (0.85 ± 90.25%) and the treatment (T2) (0.64 ± 89.50%) compared with the control treatment.

Keywords: reduced glutathione, antioxidants, parameters of sperm, 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 (Polyunsaturated fatty acid)(PUFA)، والتي تكون عرضة لعملية الأكسدة، وكذلك تجاوبها العالي مع أكسدة الدهون (Lipid Peroxidativ) (LPO)، والتي بدورها تؤدي الى خسارة متتالية في الحركة وسلامة الغشاء والقابلية الأخصابية وتضرر DNA والتغيرات الأيضية في الخلايا المنوية وتضرر DNA النطفة والخصوبة(5،6)، فعمليات التبريد والتجميد الاذابة تولد إجهاداً طبيعياً وكيميائياً على غشاء النطفة وهذا بدوره يقلل من حيوية النطف (7) وقدرتها الأخصابية (8)، ويمكن تحسين حيوية النطف وبالتالي القابلية الاخصابية عبر اضافة مضادات الأكسدة الى أوساط التجميد (9)، والتي تستخدم كاستراتيجية لتقليل الاثار الضارة للمستويات العالية من أنواع الأوكسجين التفاعلي (ROS) في مخففات السائل المنوي المبرّد (12,11,10).

يعد 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 الاخصاب المختبري (*In vitro fertilization*) (IVF) (14,13)، والذي يعمل كمادة حماية من التجميد خلال تجميد السائل المنوي (15).

المواد وطرائق العمل :

أجريت الدراسة الحالية في الحقل الحيواني ومختبرات قسم الانتاج الحيواني – كلية الزراعة – جامعة بغداد في الجادرية للمدة من شباط 2017 وحتى آذار 2017، بهدف اختبار اضافة الكلوتاثيون المختزل الى 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 عمارها بين (2 – 4) سنة وأوزانها بين (54 – 62) كغم، تم تدريبها على جمع السائل المنوي بطريقة المهبل الاصطناعي(AV) Artificial Vagina ، وتم الجمع بواقع قذفة /كبش/اسبوع، يتم تهيئة الكباش للقيام بوثبة كاذبة (False mount) لزيادة رغبتها الجنسية(16)، 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 (17). وكانت مستويات نقيع القهوة في ثلاث معاملات وكالاتي :

T1: مجموعة السيطرة (مخفف Tris).

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 يتم تقديم العلف الاخضر للحيوانات في الصباح الباكر وبعدها يقدم لها العلف المركز بمعدل 300 غم /حيوان/ يوم. واستخدم البرنامج الإحصائي Statistical Analysis System SAS– (18) في التحليل الاحصائي، على أساس التصميم العشوائي المتكامل (Completely Randomized Design (CRD)) لدراسة تأثير المعاملات المذكورة في صفات السائل المنوي المختلفة، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار Duncan (19) 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 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)

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

1 – نسبة النطف الحية (%)

يشير الجدول (2) الى تأثير مستويات مختلفة من الكلوتاثيون على النسبة المئوية للنطف الحية للسائل المنوي للكباش العواسي المحفوظ بالتبريد على درجة حرارة 5 مْ، إذ أظهرت نتائج الجدول (2) وجود تفوق عالٍ المعنوية (P< 0.01) للمعاملة (T3) على باقي المعاملات ومعاملة السيطرة في اوقات الحفظ (96,72,48ساعة)، إذ بلغت (82.50 ± 1.25، 72.25 ± 2.95 ، 67.50 ± 2.84%) على التوالي، مقارنة بمعاملة السيطرة لنفس الاوقات (81.00 ± 2.68، 54.50 ± 8.70، 40.25 ± 5.93 %) على التوالي، في حين لم يكن هنالك تأثير لوقت الحفظ بالتبريد على درجة حرارة 5 مْ على المعاملات في الزمن (0 و24 ساعة) على جميع المعاملات، وكان تأثيره معنوي (P< 0.05) على المعاملات في الزمن (48 ساعة) وعالٍ المعنوية (P< 0.01) على المعاملات في الزمن (72 و96ساعة) .

وتتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه Zeitoun وAl–Damegh (20) من ان اضافة 2 ملي مول من الكلوتاثيون المختزل الى مخفف السائل المنوي المحفوظ عند درجة 5 مْ للكباش بعد 96 ساعة من الحفظ، قد حسنت معنوياً (P < 0.05) من حيوية النطف، إذ بلغت (68±5.0 %) مقارنة مع التركيز 1 ملي مول (65±5.0%) ومع معاملة السيطرة (30±4.0 %). وتتفق هذه النتيجة مع ما اورده Ansari وزملاؤه (21) من ان اضافة 2 ملي مول من الكلوتاثيون الى مخفف السائل المنوي لثيران جاموس Nili–Ravi قد حسنت معنوياً (P≤0.05) من نسبة النطف الحية بعد 0، 3، 6 ساعة من الاذابة بعد التجميد، إذ بلغت (89.0±2.0 ،75.3±2.5 ،59.3±4.9%) على التوالي.

جدول 2: تأثير مستويات مختلفة من الكلوتاثيون ووقت الحفظ بالتبريد على درجة حرارة 5 مْ على النطف الحية (%) للسائل المنوي للكباش العواسي (المتوسط ± الخطأ القياسي)

المعاملات	الوقت (ساعة)					مستوى المعنوية
	0	24	48	72	96	
T1 **Control**	2.21±89.50 A a	4.14±81.00 A a	2.68±73.25 A b	8.70±54.50 B b	5.93±40.25 B c	**
T 2	2.04±90.00 A a	1.22±82.00 B a	2.04±75.00 C b	2.25±63.50 D ab	1.47±58.00 D ab	**
T3	1.35±94.00 A a	1.60±88.25 AB a	1.25±82.50 B a	2.95±72.25 C a	2.84±67.50 C a	**
مستوى المعنوية	NS	NS	*	**	**	-----
*** (P<0.05), ** (P<0.01), NS: Non-significant**.						

المتوسطات التي تحمل حروفاً صغيرة ضمن العمود الواحد تشير الى الفروقات بين المعاملات ،والمتوسطات التي تحمل حروفاً كبيرة ضمن الصف الواحد تشير الى الفروقات بين المدد المختلفة ضمن المعاملة الواحدة .

2 – سلامة الغشاء البلازمي (HOST) (%)

يشير الجدول (3) الى تأثير مستويات مختلفة من الكلوتاثيون على النسبة المئوية للنطف ذات الغشاء البلازمي السليم للسائل المنوي للكباش العواسي المحفوظ بالتبريد على درجة حرارة 5 مْ، إذ يتضح من الجدول (3) وجود فروق عالية المعنوية ($P< 0.01$) بين المعاملات في صفة سلامة الغشاء البلازمي (HOST)، إذ يلاحظ تفوق المعاملات (T2 وT3) بعد وقت الحفظ (48 ساعة) على معاملة السيطرة، إذ حققتا (6.91 ± 65.50، 66.25 ± 1.25 %) على التوالي، مقارنة بمعاملة السيطرة (T1) (42.50 ± 4.40 %)، ويلاحظ تفوق المعاملة (T3) تفوقاً عالِ المعنوية ($P< 0.01$) في وقت الحفظ (96 ساعة) على باقي المعاملات بما فيها معاملة السيطرة، إذ بلغت (54.50±2.39 %) مقارنة بالمعاملة (T2)(47.50±5.20 %) وبمعاملة السيطرة (T1) (30.25 ± 2.05 %). وتتفق هذه النتيجة مع ما جاء به El–Kon و Darwish (22) من ان اضافة الكلوتاثيون بتركيز 2 ملي مول الى مخفف السائل المنوي المجمد لثيران الجاموس المصري قد حسن معنويا ($P < 0.05$) من سلامة الغشاء البلازمي بعد 120 ساعة من الاذابة، إذ بلغت (23.20 ± 0.42 %) بالمقارنة مع تركيز 3 ملي مول (22.00 ± 0.32 %) ومع معاملة السيطرة (22.50 ± 0.30 %)، ويعزى هذا الى ان الغشاء البلازمي لنطف اللبائن يكون غنياً بالاحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة، وبالتالي فانه سيكون عُرضة لضرر التأكسد والذي يتبعه انخفاض في نوعية النطف (23)، ولذا فان اضافة مضادات الأكسدة الى مخففات السائل المنوي فانها ستحسن من خصائص مضاد الأكسدة في النطفة (25,24)، وهنا يشترك الكلوتاثيون (GSH) في حماية النطف ضد ضرر الأكسدة، إذ يمكنه ان يكتسح جذر بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 المتولد من الخلايا المنوية ويمنع أكسدة الدهون (27,26). ولم يكن هنالك تأثير لمدة الحفظ بالتبريد على درجة حرارة 5 مْ على نسبة سلامة الغشاء البلازمي (HOST) بالنسبة لوقت الحفظ (0 ، 24، 48 ساعة) وكان عالي المعنوية ($P< 0.01$) بالنسبة لوقت الحفظ (72 و96 ساعة).

جدول 3: تأثير مستويات مختلفة من الكلوتاثيون ومدة الحفظ بالتبريد على درجة حرارة 5 مْ على سلامة الغشاء البلازمي (HOST)(%) للسائل المنوي للكباش العواسي (المتوسط ± الخطأ القياسي).

المعاملات	الوقت (ساعة)					مستوى المعنوية
	0	24	48	72	96	
T 1 Control	2.17±81.50 A a	4.21±73.25 A a	6.06±53.50 B a	4.40±42.50 BC b	2.05±30.25 C c	**
T 2	5.18±82.50 A a	3.68±74.75 AB a	6.91±65.50 AB a	6.77±60.00 BC a	5.20±47.50 C ab	**
T 3	1.19±76.50 A a	2.42±71.25 B a	1.25±66.25 C a	1.00±61.00 D a	2.39±54.50 E a	**
مستوى المعنوية	NS	NS	NS	**	**	-----
** (P<0.01), NS: Non-significant.						

المتوسطات التي تحمل حروفآ صغيرة ضمن العمود الواحد تشير الى الفروقات بين المعاملات ،والمتوسطات التي تحمل حروفآ كبيرة ضمن الصف الواحد تشير الى الفروقات بين المدد المختلفة ضمن المعاملة الواحدة .

3 – سلامة الجسيم الطرفي (%)

يشير الجدول (4) الى تأثير مستويات مختلفة من الكلوتاثيون على النسبة المئوية للنطف ذات الجسيم الطرفي السليم للسائل المنوي للكباش العواسي المحفوظ بالتبريد على درجة حرارة 5 مْ، إذ أظهرت نتائج التحليل الإحصائي للجدول (4) وجود تفوق عالي المعنوية (P< 0.01) للمعاملة (T3) على كل من المعاملة (T2) ومعاملة السيطرة عند زمن الحفظ 96 ساعة، إذ بلغت (90.25±0.85%) بالمقارنة مع (89.50±0.64%) للمعاملة (T2) و(81.50±0.64%) لمعاملة السيطرة، وتتفق نتيجة الدراسة الحالية مع ما اورده Ansari وزملاؤه (28) الذين اوضحوا ان اضافة الكلوتاثيون بتركيز 2 ملي مول الى مخفف السائل المنوي المحفوظ بالتجميد لثيران جاموس Nili-Ravi، قد حسّن معنوياً (P≤ 0.05) من نسبة النطف ذات الجسيم الطرفي السليم بعد 0 و3 و6 ساعة بعد الاذابة، إذ بلغت (94.0 ± 1.0 و90.0 ± 1.0 و85.0 ± 1.0 %) على التوالي. ولم تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما اورده الزبيدي (29) الذي لم يجد تأثيرا معنوياً (P< 0.05) في نسبة النطف ذات الجسيم الطرفي السليم عند اضافة الكلوتاثيون المختزل بتركيز 2 ملي مول الى مخفف السائل المنوي المحفوظ بالتبريد على درجة 5 مْ لثيران الهولشتاين، إذ بلغت (14.48 ± 0.17 %) مقارنة مع معاملة السيطرة (14.16 ± 0.27 %)، ويعزى سبب التفوق ربما الى قدرة الكلوتاثيون GSH في التأثير على الأيض الخلوي

عبر إزالة السمية الناتجة من عمليات أيض النطف (30)، أو ربما لدوره في حماية الأغشية الدهنية والبروتينات والأحماض النووية من ضرر جهد الأكسدة في النطف (31).

جدول 4: تأثير مستويات مختلفة من الكلوتاثيون ومدة الحفظ بالتبريد على درجة حرارة 5 مْ على سلامة الجسيم الطرفي (%) للسائل المنوي للكباش العواسي (المتوسط ± الخطأ القياسي).

مستوى المعنوية	الوقت (ساعة)					المعاملات
	96	72	48	24	0	
**	0.64±81.50 E b	0.28±85.50 D c	0.47±89.25 C b	0.81±92.00 B c	0.86±95.50 A ab	T 1 Control
**	0.64±89.50 D a	0.47±90.75 CD b	0.47±91.75 C a	0.47±93.75 B ab	0.25±95.75 A ab	T 2
**	0.85±90.25 C a	0.47±92.25 B a	0.28±93.25 B a	0.00±95.00 A a	0.28±96.50 A a	T 3
-----	**	**	**	**	**	مستوى المعنوية
** (P<0.01)						

المتوسطات التي تحمل حروفآ صغيرة ضمن العمود الواحد تشير الى الفروقات بين المعاملات ،والمتوسطات التي تحمل حروفآ كبيرة ضمن الصف الواحد تشير الى الفروقات بين المدد المختلفة ضمن المعاملة الواحدة .

نستنتج مما سبق ان إضافة الكلوتاثيون المختزل بوصفه مضاد أكسدة صناعي بتركيز (60 ملغم / 100 مل) الى مخفف Tris أدى الى تحسن في صفات النطف المحفوظة بالتبريد لدى الكباش العواسي قيد الدراسة، وامكانية استخدامها مستقبلاً في زيادة نسبة الخصوبة لدى الأغنام الملقحة اصطناعياً.

References:

1. **Albiaty, Nameer M. H; Alobaidi, Hazem J. K; Kareem, Abbas F; Al-Hakim, Ali M; Alnaeb, Anmar Y; Alkhazraji, A. A. H. (2015)** Effect of extenders and preservation periods in some semen characteristics of awassi rams. *World Journal of Pharamaceutical Research*, 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. *Animal Reprod Sciences*, 145:47-53.
3. **Agarwal A, Makker K, Sharma R.(2008)** Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *American Journal of Reproductive Immunology*. 59, 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 Research*. 19:207-210.
5. **Peruma P; Chamuah JK; Rajkhowa C. (2013)** Effect of catalase on the liquid storage of mithun (Bos frontalis) semen. *asian pacific journal reproduction* 2:209–214.
6. **Büyükleblebici, O; Büyükleblebici, S; Taşdemir U, Tuncer PB,(2016)** The Effects of Different Antioxidants on Post-thaw Microscopic and Oxidative Stress Parameters in the Cryopreservation of Brown-Swiss Bull Semen. *kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi Journal* 22 (1): 101-107, 2016.
7. **hang, X. G; Liu, Q; Wang, L. Q; Yang, G. S; and Hu, J. H. (2016).** Effects of glutathione on sperm quality during liquid storage in boars. *Animal Science Journal*, 87(10), 1195-1201.
8. **Stradaioli, G; Noro, T; Sylla, L; and Monaci, M. (2007).** Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology*, 67(7), 1249-1255.
9. **de Oliveira, R. A; Wolf, C. A; de Oliveira Viu, M. A; & Gambarini, M. L. (2013**). Addition of glutathione to an extender for frozen equine semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(12), 1148-1152..
10. **Zanganeh, Z; Zhandi, M;Zare-Shahneh, A; Najafi, A; Nabi, M. M; and Mohammadi-Sangcheshmeh, A. (2013). Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation***?. Small Ruminant Research,* 114(1), 120-125.
11. **Ghadimi, V; Zhandi, M; Towhidi, A; Shehab-El, 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. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(11), 1329-1332
12. **Sharafi, M; Zhandi, M; and Sharif, A. A. (2015).** Supplementation of soybean lecithin-based semen extender by antioxidants: complementary flowcytometric study on post-thawed ram spermatozoa. *Cell and tissue banking*, 16(2), 261-269.
13. **Abeydeera L. R;(2002)** In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology*, 57:257-273.
14. **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. *Animal Reproduction Science*, 99(3-4):401-407.
15. **Munsi, M. N; Bhuiyan M. M. U; Majumder S. and Alam M. G. S; (2007)** Effects of exogenous glutathione on the quality of chilled bull semen. *Reproduction Domestic Animal*, 42(4): 358-362.

16. **AA Al-Ani; and TA Abdulkareem 2012**. Influence of month on some sexual beviour and semen characteristics in Holstein-Friesian bulls. Al-Anbar Journal of Veterinary Sciences. *5*(2), 265-274.
17. **Moce, E**; **Blanch, E; Tomas, C; Graham, J. K. (2010)** Use of cholesterol in sperm cryopreservation : Present moment and perspectives to future. *Reprodution Domest Animal Sciences*, 45(3):67-75.
18. **SAS.(2012)** Statistical Analysis System. User´s Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C;USA.
19. **Duncan, D. B**, **(1955)** Multiple Ranges and Multiple F-test. Biometrics, 11:4-42.
20. **Zeitoun, M. M; and 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 Animal Sciences*, *5*, 50-58.
21. **Ansari M.S**; **Rakha B.A**; **Iqbal R; Akhter S; (2014)** Effect of Glutathione in Extender on the Freezability of Sahiwal Bull Spermatozoa. *Pakistan Journal Zool.* 46(1): 17-21.
22. **El-kon, I. I; and Darwish; S. A; (2011)** Effect of Glutathione (GSH) on Microscopic Parameters and DNA Integrity in Egyptian Buffalo Semen During Liquid and Frozen Storage. *Journal of Reproduction and Infertility* 2 (3): 32-40.
23. **Griveau JF; Dumont E; Renard P; Callegari JP; Le Lannou D; (1995**) Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 103: 17-26.
24. **Yildiz C; Kaya A, Aksoy M; Tekeli T.(2000)** Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 54 , 579–585.
25. **Sariozkan S; Turk G; Canturk F; Yay A; *Eken* A; Akcay A. (2013)** The effect of bovine serum albumin and fetal calf serum on sperm quality, DNA fragmentation and lipid peroxidation of the liquid stored rabbit semen. *Cryobiology* 67, 1–6.
26. **Baker, M. A; Aitken, R. J; (2004)** The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. Mol. Cell. Endocrinol. 216, 47–54.
27. **Maia, M. S; Bicudo; S. D; Sicherle; C. C; Rodello; L. and Gallego; I.C.S;(2010)** Lipid Peroxidation and Generation of Hydrogen Peroxide in Frozen-Thawed Ram Semen Cryopreserved in Extenders with Anti-Oxidants. *Animal Reproduction Science*, 122, 118-123.
28. **Ansari, M. S; Rakha, B.A; Ullah, N; Andrabi, S. M. H; Iqbal, S; Khalid, M. and 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, 235-244.

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. Dematos, D. G. and C. C. Furnus. (2000) The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development. Effect of beta-mercaptoethanol, cystein and cysteine. *Theriogenology*, 53: 761-771.

31. Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism, (2005) measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *India Journal Exp Biology*. 43: 963-974.