دراسة تأثير عوامل الأكسدة على حيوية النطف في السائل المنوي المجمد لثيران الفريزيان هولشتاين والمسال بدرجات حرارة ومدد مختلفة

افتخار مهدي كاظم النجار هند فائق مهدي الشمري
أستاذ مساعد
الكلية التقنية- المسيب / جامعة الفرات الأوسط التقنية
البريد الالكتروني:hind.faik@yahoo.com

المستخلص

أن هدف هذه الدراسة هو تقييم تأثير عوامل الأكسدة من خلال قياس مضادات الأكسدة الأنزيمية (Total antioxidant capacity TAC) و (Glutathione peroxidase GPx) و (Superoxide dismutase SOD) ومؤشرات الأكسدة (Malondialdehyde MDA) و Hydroxydeoxyguanosine (8- 8-OHdG) على نسبة الحركة والحيوية والتشوهات للنطف أثناء أسالة إذابة السائل المنوي المجمد في درجات (37 درجة مئوية لمدة 30 ثانية كمجموعة سيطرة و40 درجة مئوية لمدة 20 ثانية و 50 درجة مئوية لمدة 10 ثانية) لتحديد الدرجة المثلى والمدة الملائمة لتحسين صفات السائل المنوي بعد الإذابة وتطوير قدرته على الأخصاب أثناء عمليات التلقيح الاصطناعي. جُمع السائل المنوي من 10 ثيران فريزيان هولشتاين في مركز التلقيح الاصطناعي/أبو غريب وأتبعت طريقة المركز في التخفيف والتعبئة والتبريد والتجميد أذ جُهزت 30 قصبة لكل ثور قسمت الى ثلاث مجاميع لأجراء فحوصات الإسالة للسائل المنوي. وأجريت الفحوصات الفسلجية لبيان تأثير حالة السائل المنوي في نسبة الحركة والحيوية والتشوهات كما أجريت الفحوصات البايوكيمياوية على البلازما المنوية لقياس مضادات ومؤشرات الأكسدة، وبينت النتائج زيادة معنوية في نسبة الحيوية والحركة للنطف وانخفاض معنوي في نسبة التشوهات، ان تركيز MDA و8-OHdG في حالة الإسالة (50°م لمدة 10ثانية) مقارنة بمجموعة السيطرة التي

أظهرت ارتفاع عالي المعنوية (أ≥0.01) في نسبة الحركة والتشوهات ومستوى MDA وGPx و8-OHdG وSOD وTAC. كما بينت الدراسة أن هناك ارتباط بين مضادات الأكسدة ومؤشراتها وبعض صفات السائل المنوي فقد أُرتبط كل من MDA و 8−OHdG ارتباط سلبي مع تركيز الحركة والحيوية وارتباط موجب مع التشوهات، كما أُرتبط كل من SOD و GPx و TAC ارتباط موجب مع الحركة والحيوية وارتباط سلبي مع التشوهات .

مفاتيح الكلمات: عوامل الأكسدة، أنواع الأوكسجين التفاعلي، الحيوية، مضادات الاكسدة، الخصوبة، فريزيان هولشتاين

البحث مستـــل من رسالة ماجستير للباحث الأول

Effect of oxidative factor on quality of Frizian-holeshtine bull frozen-thawed semen and after thawed in different temperature and duration

AL-Najar.E.M.K **AL-Shemmary.H.F.M**

Assistant Professor

Al-Musaib Technical college / Al-Furat al-awsat Technical University.

E-mail: hind.faik@yahoo.com

Abstract:

The aim of the study is to evaluate the effect of oxidative factors on sperm quality (motility, viability, and abnormality) through the estimation of enzymatic antioxidant Superoxide dismutase (SOD) , Glutathione peroxidase (GPx) , and Total antioxidant capacity (TAC). And oxidative marker Malondialdehyde (MDA), and 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) in different thawing temperature and duration (37ºc for 30secnd as control group , 40ºc for 20second and 50ºc for 10second) to determine the optimum temperature and duration which improve the seminal quality and developed the ability of fertilization during Artificial Insemination(AI). The semen was collected from the Frizian-holeshtine bull in Abo-Graib AI center then; they have been diluted, packed, cooled and frozen according to the protocol of AI-center. 30 straws of each bull was supplied and divided in to 3 group to conduct physiological and biochemical test. The physiological had been conducted to determine the effect of thawing state of semen on the (Motility%, Viability%, and Abnormalities %). Biochemical test had been conducted on seminal plasma to measure (SOD, GPx, TAC, MDA, 8-OHdG).The result show significant increase ($p \leq 0.01$) in the viability and motility ($p \leq 0.05$) and significant decrease in abnormality , MDA and 8-OHdG concentration in thawing state of (50°c for10second) compared with control state (37ºc for 30second) which demonstrated high significant increase in motility, abnormalities and (MDA, 8-OHdG , SOD , GPx and TAC) concentration. Also the study show negative correlation between (MDA, 8-OHdG) and motility, viability and negative correlation with abnormalities . Also show that there was positive correlation between (SOD, GPx, TAC) with viability and motility and negative correlation with abnormalities.

Key words: Oxidative factor, ROS, Viability, Antioxidant, fertility, Frizian-holeshtine

المقدمة:

أن عوامل الأكسدة هي أحد العوامل المبهمة التي تؤثر على قوة الخصوبة في الثيران (2). وعلى الرغم من أن مستويات فسيولوجية قليلة من أنواع الأوكسجين التفاعلي (Reactive Oxygen Species ROS) قد تكون ضرورية للقيام بوظائف النطفة الطبيعية كالتكيف وتفاعل الأكروسوم والتحام النطفة بالبيضة (5)، لكن إفراز كميات كبيرة منها في السائل المنوي يمكنها أن تؤدي إلى الإجهاد التأكسدي وبمجرد تغيير التوازن مابين مستويات عوامل الأكسدة مع النظام المضاد للأكسدة في السائل المنوي يؤدي إلى الإضرار بوظائف النطف

(40) نتيجة الأضرار بغشاء النطف (7) وDNA (26) والأضرار بالمايتوكوندريا (41) لقد حفظ السائل المنوي للثيران منذ أكثر من نصف قرن لأغراض التلقيح الاصطناعي ولايزال السائل المنوي المجمد يستعمل بشكل واسع في أنحاء العالم (36) . ومن المعروف أن طرق حفظ السائل المنوي بالتجميد تؤدي الى انتاج أنواع الأوكسجين التفاعليROS التي تحفز عملية انتاج بيروأكسدة الدهون Lipid peroxidation (LPO) في غشاء الحيمن وتحطيم الحامض النووي DNA له وتثبيط النشاط الأنزيمي المضاد للأكسدة والذي سينعكس سلبيا (14) على حركة وحيوية النطف وقدرتها على الإخصاب وأن التحرر المستمر لعوامل الأكسدة ذات النشاط التفاعلي ROS من أيض الخلايا الغير سوية والغير ناضجة، وكذلك من خلال عمليات التجميد والإسالة(37) والتي غالبا ما تصاحب بانخفاض مستوى مضادات الأكسدة في النطف والسائل المنوي مؤدية إلى (37) والتي غالبا ما تصاحب بانخفاض مستوى مضادات الأكسدة في النطف والسائل المنوي مؤدية إلى الإجهاد التأكسدي للنطفة، الإجهاد التأكسدي للنطفة، والأكثر من ذلك انخفاض مضادات الأكسدة الداخلية الأنزيمية واللاأنزيمية مثل:SOD و GPx (9) (14) ، كذلك فيتامين C,E,A والكلوتاثيون (1). ان عملية التجميد والإسالة خطوتين كبيرتين ومهمتين في عملية حفظ النطف بالتجميد ولها تأثير عظيم على تركيب ووظيفة النطف (1) . ان أهم التغيرات التي تحصل عند تجميد وإسالة السائل المنوي هي الاختلاف في سلسلة الأحماض الشحمية الغير مشبعة الموجودة في غشاء النطف والتي تحتاج إلى نظام مضاد للأكسدة ضد عملية انتاج بيروأكسدة الدهون، وهذا النظام موجود في سايتوبلازم النطفة الذي يلفظ اغلبه في المراحل الأخيرة من عملية تكوين النطف (18) . كذلك فأن التجميد والإسالة ينتج عوامل إجهاد فيزيائية وكيميائية على غشاء النطفة ويولد ROS عن طريق النطف الميتة أو عن طريق الأوكسجين الجزيئي للبيئة فيقلل الحركة وحيوية الغشاء والقدرة على الإخصاب في التلقيح الأصطناعي (43) بالإضافة إلى ذلك فأن صدمة البرد تشكل إجهاد آخر فأنها تلعب دور مهم في قولبة غشاء النطفة بتحديد التوازن مابين التركيب الجيلاتي والمحلول sol_gel (balance) والحالة الجزيئية التي تؤثر على التحام غشاء البلازما بكميت الذكر مع كميت الأنثى (8) . إن عملية الإسالة للسائل المنوي المجمد من ($^{-}$196°م إلى38°م) وهذه الزيادة السريعة والتغير المفاجئ للحرارة يطلق طور انتقالي سريع من الحالة الصلبة إلى السائلة والتغير العنيف في توليد ROS الذي يؤدي إلى انخفاض نسبة الحركة للسائل المنوي المجمد/المسال (35). إن أهم مشاكل التلقيح الأصطناعي قد تعود إلى عدم كفاءة وسائل إسالة السائل المنوي المجمد المتمثلة بدرجات الحرارة المستخدمة للإسالة والوقت اللازم لها، أذ أتبعت طريقة الأسالة 37°م لمدة 30 ثانية أو 38°م لمدة 20 ثانية في بعض مراكز التلقيح الأصطناعي وأُستعملت كدرجة مثلى للإسالة (10) ، ولم يدرس علاقة الاختلاف في درجات حرارة الأسالة مع عوامل الأكسدة في السائل المنوي المذاب . لذا فأن هدف الدراسة هو تحديد تأثير عوامل الأكسدة على مواصفات السائل المنوي الحركة والحيوية والتشوهات في كل من درجات حرارة الإسالة ومددها (37°م لمدة 30 ثانية

و40°م لمدة 20 ثانية و50°م لمدة 10 ثانية) واختيار درجة الحرارة والمدة الأفضل للإسالة لتحسين الحيوية والقدرة على الأخصاب، وكذلك دراسة معامل الارتباط مابين مؤشرات ومضادات الأكسدة ونوعية السائل المنوي.

المواد وطرائق العمل:

أُجريت الدراسة في مختبرات الكلية التقنية/المسيب وفي مركز التلقيح الأصطناعي/أبوغريب التابع لدائرة الثروة الحيوانية / وزارة الزراعة وفي قسم علوم الحياة/جامعة بابل، للمدة من تشرين الأول/2016 وحتى آذار/2017. جُمعت عينات السائل المنوي من 10 ثيران فريزيان هولشتاين ، وحسب مسمياتها وأرقامها أشهب(267) و شمس(681) و بحر(17750) و أزرق(995) و عذب(581) و وادي(528) و سور(499) و قمر(514) و عنود(17768) و ربيع(17760)، وبعمر يتراوح بين (3–4 سنوات)، وبواقع قذفة واحدة/ اسبوع/ ثور، وبمعدل وزن (350–450) كغم. وجُمع السائل المنوي باستعمال المهبل الأصطناعي (Artificial vagina)، وبعد الجمع أُتبعت طريقة المركز في التخفيف والتعبئة والتبريد والتجميد، وجُهزت 30 قصبة لكل ثور وقُسمت إلى ثلاثة مجاميع لأجراء الفحوصات الفسلجية والبايوكيميائية في درجات الأسالة المختلفة.

وأُجريت الفحوصات الفسلجية أذ قِيست الحركة الفردية بأستعمال المجهر الضوئي تحت قوة تكبير 40x وذلك بوضع قطرة من السائل المنوي المجمد المذاب على شريحة زجاجية وغُطيت بغطاء رقيق (Cover slip) ووضعت على المسرح الدافئ الخاص بالمجهر وبدرجة حرارة 37°م لمدة 30 ثانية. حسب التقديرات التي ذكرها (25) وهي (صفر) تكون كافة النطف غير متحركة و(10–20)% تكون بعض النطف متحركة و (30–40) % تكون غالبية النطف غير متحركة و(50–60)% تكون نصف النطف متحركة و(70–80) تكون غالبية النطف متحركة و(90–100)%تكون كافة النطف متحركة.

كما قِيست نسبة النطف الحية والميتة بأجراء فحص الحيوية فأخذت قطرة من السائل المنوي وخلطت مع قطرة من الأيوسين والنكروسين على شريحة زجاجية ثم عملت مسحة خفيفة بأستعمال شريحة زجاجية أخرى وجُففت بالهواء وفُحصت بأستعمال المجهر الضوئي على قوة 40x (23).

ثُم قِيست النسبة المئوية للنطف المشوهة وذلك بأجراء فحص الشكل للنطف بأستعمال صبغة الأيوسين والنكروسين وتفحص تحت المجهر على العدسة الزيتية وبقوة تكبير 1000x. وحُسبت التشوهات للنطف بعد الأسالة (25).

وكذلك أُجريت الفحوصات البايوكيمياوية لقياس كل من مؤشرات الأكسدة كقياس MDA في البلازما المنوية حسب طريقة العمل المسماة Yagi method (42)، و 8-OHdG أيضا قِيس في البلازما المنوية حسب التعليمات الموجودة بالعدة التجارية 8-Hydroxydeoxyguanosine ELISA Kit (USA) (33). كما قِيست مضادات الأكسدة كقياس SOD في البلازما المنوية حسب التعليمات الموجودة في

العـــــدة التجاريـــــة Superoxide dismutase ELISA Kit (USA) (29)، و GPx أيضا قِيس فـي البلازمـا المنويـــة حسـب طريقة العمل المسمـاة (Gunzler وFlohé) (19) ، و TAC قِيس في البلازمـا المنوية حسـب التعليمات المـوجودة في العـدة التـجارية Total antioxidant capacity assay (USA) ELISA KIT(6).

التحليل الإحصائي:

استُعمل البرنامج الإحصائي SAS (32) في تحليل البيانات لدراسة تأثير العوامل المختلفة في الصفات المدروسة وفق تصميم عشوائي كامل (CRD) لدراسة تأثير حالة السائل المنوي او الثور، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار Duncan (15) متعدد الحدود.

الانموذج الرياضي الاول: لدراسة تأثير المعاملة (حالة السائل المنوي).

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

أذ أن :

Yij: قيمة المشاهدة j العائدة للمعاملةi .

µ: المتوسط العام للصفة المدروسة.

Ti: تأثير المعاملة i (ثلاث مستويات).

eij: الخطأ العشوائي الذي يتوزع توزيعا طبيعيا بمتوسط يساوي صفر وتباين قدره $\sigma 2e$.

الانموذج الرياضي الثاني: لدراسة تأثير الثور.

$$Yij = \mu + Bi + eij$$

Bi: تأثير الثور i (10 ثيران).

النتائج والمناقشة:

أظهرت النتائج أن تأثير درجة الحرارة والمدد المختلفة للإسالة معنوياً في كل من الحركة والتشوهات والحيوية (جدول1). فتفوقت مجموعة السيطرة (الإسالة بدرجة 37°م لمدة 30 ثانية) في الحركة (52.00) على الإسالة الثانية والثالثة وقد أظهرت (الإسالة بدرجة 50°م لمدة 10ثانية) نسبة حركة أعلى (48.60) من الأخيرة بفروقات معنوية بمستوى (أ≥0.05)، أما بالنسبة للتشوهات فقد أظهرت (الإسالة بدرجة 50°م لمدة 10ثانية) أقل نسبة تشوهات (9.60) تلتها (الإسالة بدرجة 40°م لمدة 20ثانية)(10.70) وبفروقات معنوية بمستوى (أ≥0.01)، أما بالنسبة للحيوية فقد تفوقت حالة السائل المنوي الثالثة على كل من مجموعة السيطرة والحالة الثانية (50.85) وكانت مختلفة معنويا بنسبة (أ≥0.01) ولم تختلف الحالة الثانية عن الأولى معنوياً.

جدول 1: تأثير حالة السائل المنوي (درجة الحرارة والمدد المختلفة للإسالة) في نسبة الحركة الفردية والتشوهات والحيوية

حالة السائل المنوي	العدد	المتوسط ± الخطأ القياسي		
		الحركة (%)	التشوهات (%)	الحيوية (%)
اسالة بدرجة 37° مئوي لمدة 30ثانية	10	A1.33 ±52.00	A0.37 ±11.60	B 2.76 ±40.42
اسالة بدرجة 40° مئوي لمدة 20ثانية	10	B1.20 ±46.50	B0.26 ±10.70	B 2.71 ±43.01
اسالة بدرجة 50° مئوي لمدة 10ثانية	10	AB1.43 ±48.60	C0.16±9.60	A 2.33 ±50.85
مستوى المعنوية	---	*	**	**

* (P<0.05)، ** أ≥0.01

المتوسطات التي تحمل حروف متشابهة ضمن العمود الواحد لاتختلف معنويا فيما بينها.

كما أظهرت نتائج الدراسة أن بروتوكول الإسالة (درجة الحرارة والمدة) يؤثر على الصفات الحيوية للسائل المنوي المجمد المسال (حركة–تشوهات–نسب النطف الحية). بينت الدراسة أن الإسالة بدرجة 50°م لمدة 10 ثانية يحسن حركة النطف أكثر من درجة 40°م لمدة 20 ثانية وعلى الرغم من تفوق درجة الإسالة 37°م لمدة 30 ثانية في الحركة تتفق هذه النتائج مع ما وجده (4) الذي ذكر بأن نسبة الحركة والحيوية تحسنت في كل من درجة 60°م لمدة 8 ثانية و 37°م لمدة 30 ثانية ولكن أستعمال الثانية في الحقل أسهل، أي أن إسالة السائل المنوي في الدرجة الأعلى والأسرع من 37°م لمدة 30 ثانية لا تسمح بإعادة تبلور الثلج خلال الخلية. كذلك تتفق الدراسة مع ما وجده (28) حيث أثبت أن الأسالة بالدرجات العالية البطيئة تؤدي الى قلة الحركة والحيوية وزيادة التشوهات بسبب حدوث الضرر لغشاء البلازما وحصول التغيرات الحاصلة بالضغط الاوزموزي نتيجة أعادة تبلور جزيئات الماء داخل النطفة فتؤدي الى زيادة الإجهاد التأكسدي بسبب زيادة ROS. ثبت أن الأسالة التي تستغرق سرعة قصوى وبدرجة أعلى من 37°م تزيد من عدد النطف التي تحتفظ بالحركة القصوى ويقلل التأثير المؤذي للعودة للتبلور والجفاف. أن النطف التي تسال بدرجات عالية وسريعة تتعرض لمدة قصيرة الى المذيبات المركزة والجليسيرول وتستعيد التوازن ما بين داخل وخارج الخلية وبسرعة بينما الأسالة البطيئة حتى ولو بدرجات عالية تؤدي الى حموضة غير مستقرة (PH Fluctuation) فتؤدي الى تفكك البروتينات ودهون الخلية (3) . لم يلاحظ (27) أي اختلافات في الحركة بعد الأسالة بدرجات مختلفة ولفترات مختلفة (18.3%:40ثانية/35°م، 18.1%:15ثانية/50°م، 16.7%:5ثانية/70°م) كما أظهرت الدراسة أن الأسالة بدرجة 50°م لمدة 10 ثانية قد حققت أقل نسبة تشوهات (9.60) وأعلى نسبة حيوية (50.85) ونسبة حركة (48.60) مقارنة بدرجة إسالة 37°م لمدة 30 ثانية وهي السيطرة وبذلك تتفق الدراسة مع (30) الذي وجد أن

الأسالة بدرجة 50°م لمدة 10 ثانية تحقق أعلى نسبة حركة وحيوية أكثر من درجة 70°م لمدة 6 ثانية ومقارنة بدرجة 37°م لمدة 30 ثانية .

لقد أوضحت النتائج في (جدول2) تأثير حالة السائل المنوي بعوامل الأكسدة حيث أن (الإسالة بدرجة 50°م لمدة 10 ثانية) أنتجت أقل التراكيز في مؤشرات الأكسدة MDA الناتج الجانبي لبيروأكسدة الدهون والذي يشير الى ضرر غلاف البلازما في النطف (1.846) وكذلك في مستوى 8-OHdG والذي يعبر عن الضرر الموجود في DNA النطف وقد بلغ (1.176) أقل من حالة السيطرة. وقد ظهر أن تأثير حالة الأسالة على مضادات الأكسدة واضحا في (جدول 2) في مستويات SOD حيث ارتفع في حالة (الأسالة 37°م لمدة 30ثانية) (2.981) وكان في درجة (الأسالة 50°م لمدة 10ثانية) (0.933) أكثر مستواه في (الأسالة بدرجة 40°م لمدة 20 ثانية) (0.692) وكانت الفروقات معنوية بمستوى (أ≤0.01)، كما أظهر الأنزيم GPx ارتفاع في حالة (الأسالة الأولى 37°م لمدة 30 ثانية) حيث بلغ (11.23) وتفوقت درجة (الأسالة الثالثة 50°م لمدة 10 ثانية) (9.82) على درجة (الأسالة 40°م لمدة 20 ثانية) (7.35) وكانت الفروقات معنوية بمستوى (أ≤0.01)، لقد أظهرت الكفاءة الأنزيمية المقاومة للأكسدة والمتمثلة بتراكيز TAC تفوقا في حالة (الأسالة الأولى37°م لمدة 30 ثانية) وبلغت (579.46) ولم تختلف درجتي الاسالة الأخريين معنوياً في تركيزه وكانت الفروق بين ثلاث حالات معنوية بمستوى (أ≤0.01).

جدول 2: تأثير حالة السائل المنوي (درجة الحرارة والمدد المختلفة للإسالة) في عوامل ومضادات الأكسدة

حالة السائل المنوي	العدد	المتوسط ± الخطأ القياسي				
		MDA (nmol/ml)	8-OHdg (ng/ml)	SOD (ng/ml)	GPx (mU/ml)	TAC (mM)
اسالة بدرجة 37° مئوي لمدة30ثانيه	10	± 3.89 A 0.19	± 1.849 A0.09	± 2.981 A 0.04	± 11.23 A0.23	± 579.40 A 32.02
اسالة بدرجة 40° مئوي لمدة20ثانيه	10	±3.04 B 0.16	± 2.650 B 0.19	± 0.692 C 0.02	± 7.35 C0.25	± 330.60 B 23.12
اسالة بدرجة 50° مئوي لمدة10ثانيه	10	±1.846 C0.13	1.176± C 0.13	±0.933 B 0.01	± 9.82 B 0.16	± 334.40 B 23.14
مستوى المعنوية	--	**	**	**	**	**

** (أ≤0.01).

المتوسطات التي تحمل حروف متشابهة ضمن العمود الواحد لاتختلف معنويا فيما بينها

أن حركة النطف السريعة تعتمد على الطاقة المتولدة من الأكسدة الفسفورية للمايتوكوندريا في القطعة الوسطية للنطف وتنتج من هذه العملية تراكيز عالية من الجذور الحرة داخل وخارج خلايا النطف (20) (43) وأن زيادة

أنتاج ROS سوف تؤذي غشاء النطف فتؤدي الى ضعف الحركة وتقل الحيوية وذلك بعد الخزن في درجات حرارة منخفضة حتى تقلل في أختراق النطف لمخاط عنق الرحم (17) وعندما تتجمد خلايا السائل المنوي ثم تُسال فأن النطف تتعرض الى أنواع من الإجهاد (10) كصدمة البرد والإجهاد التأكسدي الذي يزداد خلال تبلور الثلج وعملية بيرواكسدة الدهن وهما يؤديان الى تغيرات تركيبية مؤذية للغشاء البلازمي الذي يحتوي على أحماض دهنية غير مشبعة فتزداد حساسيته لعملية البيروأكسدة لها عندما يكون هناك أنتاج عالي للROS خلال التجميد والإسالة (39) (31). أن ميكانيكية الدفاع المضاد للأكسدة موجودة داخل النطفة والبلازما المنوية ولكنها غير كافية على منع الإجهاد التأكسدي خلال عمليات التجميد والإسالة بل أن عملية التجميد والإسالة تزيد الضرر عن طريق صدمة البرد وتكون بلورات الثلج وتأثير المحاليل الملحية المتكونة وأعاده تشكيل الدهون والبروتين في الأغشية، وأوضح (12) أن أعظم تأثير لعوامل الأكسدة يحصل للخلية خلال التجميد السريع والإسالة البطيئة حيث تتعرض الأغشية (البلازما–أكروسوم–المايتوكوندريا) وDNA الى الضرر وبذلك فأن مضادات الأكسدة لا تمكنها من أن تصلح الضرر لأن فعاليتها لا تتغير خلال التجميد ولأنها تعمل بنظام البفر (Buffer system) فقط لتحافظ على التوازن داخل الخلية (Intracellular homeostasis) من عمليات الأيض الفسلجية للنطف لذا ينصح بإضافة مضادات الأكسدة للسائل المنوي عند تجميده مثل الكاتاليز (CAT) و(GPx) . أن عوامل الأكسدة تزداد بعد إسالة السائل المنوي المجمد فتؤدي الى ضرر ليس في الغشاء فحسب بل تؤدي الى ضرر في سلامة DNAالذي يتأثر بأنواع الحافظات والاختلاف في درجات الحرارة، وهذا مايفسر زيادة 8-OHdG في الاسالة 37°م لمدة 30 ثانية. كما أكد ذلك (13) في الثيران الذي وجد أن هناك ارتباط بين ديمومة DNA وديمومة الغشاء البلازمي وهذا ما يفسر النتائج في جدول رقم (2) حيث أن الأسالة بدرجة 37°م لمدة 30 ثانية أظهرت زيادة في MDA و 8-OHdG بالرغم من ارتفاع مستويات مضادات الأكسدة في البلازما المنوية .

كما أوضحت الدراسة في (جدول 3) أن هناك ارتباط بين مضادات الأكسدة ومؤشرات الأكسدة وبعض صفات السائل المنوي الحيوية كالحركة التي ترتبط ارتباطا سلبيا مع كل من MDA ($^-$0.42) و8-OHdG ($^-$0.38) وبمستوى معنوي (أ≥0.01)، في حين أرتبط كل منSOD (0.44) وGPx (0.53) مع الحركة ارتباطا موجبا معنوياً وبمستوى (أ≥0.01)، كما أرتبط TAC (0.23) ارتباطا موجبا غير معنوي مع الحركة. أما بالنسبة للتشوهات فقد ارتبطت ارتباطا غير معنويا موجبا مع كل من MDA (0.13) و(0.11) 8-OHdG، في حين ارتبطت ارتباطا سالبا معنوي مع أنزيم SOD (0.63) (أ≥0.01) وقد أظهر GPxارتباطا غير معنوي سالبا مع التشوهات (−0.21)، أما الكفاءة الأنزيمية المضادة للأكسدة TAC فقد أظهرت ارتباط سلبي مع التشوهات(−0.57) وبمستوى (أ≥0.01). أظهرت الدراسة أن مستويات 8-OHdG و MDA قد ارتبطت

ارتباطا سالبا مع نسبة الحيوية (–0.34) (–0.07)، في حين أرتبط كل من SOD و GPx و TAC ارتباطا معنوياً (0.56) وبمستوى (أ≥0.01) و(0.30) بمستوى (أ≥0.01) و(0.63) بمستوى (أ≥0.01).

جدول 3: معامل الارتباط بين صفات السائل المنوي ومؤشرات الاكسدة المدروسة

الصفات	الحركة (%)	التشوهات (%)	الحيوية (%)
MDA	*0.42 –	NS 0.13+	* 0.34–
8-Ohdg	* 0.38–	NS 0.11+	NS 0.07–
SOD	** 0.44	** 0.63–	** 0.56
GPx	** 0.53	NS 0.21–	* 0.30
TAC	NS 0.23	** 0.57–	** 0.63
* (أ≥0.05)، ** (أ≥0.01)، NS: غير معنوي.			

أظهرت الدراسة علاقة غير مباشرة بين بيرواكسدة الدهن المتمثلة بتركيز MDA وحركة الحيامن أكدت من قبل (22) وهذا يفسر معامل الارتباط السلبي المعنوي مابين MDA وهو الناتج الجانبي لعملية بيرواكسدة الدهن والحركة وكذلك أكدت من قبل (24). اظهرت الدراسة في جدول (3) ان معامل الارتباط معنوي بين GPx وSOD مع الحركة وذلك لان مضادات الاكسدة تمنع عملية بيرواكسدة الدهن في (Normozoospermic sample) وليس تحت الحالة المرضية وبالتالي تؤدي الى زيادة حركة النطف. كما اظهرت الدراسة ان TAC يرتبط مع الحركة ارتباطا موجبا غير معنويا تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه (16) اذ ان الارتباط الغير مباشر مابين TAC و ROS وان الأخيرة تؤدي الى زيادة استهلاك مضادات الاكسدة اللاانزيمية الذائبة في البلازما المنوية وبالتالي فأن زيادة ROS تؤدي الى تأثير سلبي على الحركة (34) . ان عملية الاسالة تستحدث اذى الاكسدة وأن زيادة MDA الناتج من عملية بيرواكسدة الدهن في الغلاف البلازمي للنطفة والناتجة من هجوم عوامل الأكسدة الفعالة ROS على الأحماض الدهنية الغير مشبعة مؤدية الى تفككها، أما زيادة–8 OHdG الذي ينتج فور البدء بتكسر خيوط الكروماتين وضررDNA ، وعلى الرغم من أن مستويات مضادات الأكسدة SOD وGPx وTAC كانت الأعلى عند حالة الأسالة في درجة 37°م لمدة 30 ثانية فأنها غير قادرة على أصلاح الضرر الناتج من LPO حيث أن الغلاف البلازمي المتضرر يكون غير قادر على امتصاص مضادات الأكسدة في البلازما المنوية الى داخل النطف وهذا يتفق مع (37) ، لذا تعتبر حالة الأسالة بدرجة 50°م لمدة 10 ثانية هي أفضل الدرجات للإسالة لقلة كل من MDA و 8–OHdG وزيادة كل من مستويات SODوGPx على مستويات الحالة الثانية 40°م لمدة 20 ثانية كما ظهر أنها تحسن الحركة والحيوية وتقلل التشوهات الحاصلة بسبب التدفق السريع للأوكسجين الفعال بعد استئناف الايض وزيادة ROS يؤدي الى التفاعل مع الاحماض الدهنية الغير مشبعة في الغلاف ومع القواعد النيتروجينية الموجودة في سلسلة DNA

وتؤدي الى تفككها، وهكذا فان هناك ارتباط سلبي مابين 8–OHdG والحركة يتفق مع ما توصل اليه (24) ومع (38). أظهر MDA ارتباط موجب مع التشوهات حيث ان النطف الغير ناضجة تعتبر مصدر اساسي لإنتاج ROS في السائل المنوي (16) (24) حيث وجدوا ان هناك ارتباط موجب مباشر بين مستوى ROSوالذي يعبر عنه بمؤشرات الأكسدة MDA و 8–OHdG وبين معدل التشوهات. أن الحيامن الغير ناضجة تولد Superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$) وهذا يتحول الى بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) عن طريق فعالية SOD وازالة سمية بيروكسيد الهيدروجين تكون عن طريق GPx وSOD، اذ أن بيروكسيد الهيدروجين من أنواع الأوكسجين الفعال وكميات عالية منه تحدث بيرواكسدة الدهن للغشاء فتؤدي الى موت الخلية لذا فان التوازن بين SOD في السائل المنوي مهم للحفاظ على حيوية وحركة النطف لذا فأن SOD يرتبط ارتباطا موجبا مع الحركة وسالبا مع التشوهات تتفق هذه النتائج مع (21). أظهرت الدراسة أن TAC يرتبط ارتباط موجب غير معنوي مع الحركة وارتباط سالب معنوي مع التشوهات وهذا يتفق مع ما توصل اليه (24) كما أظهرت الدراسة ارتباط سلبي مابين 8–OHdG وMDA وبين الحيوية لان عملية بيرواكسدة الدهن تؤدي الى الاضرار بالأغشية (البلازما، المايتوكوندريا، الاكروسوم) وان ضرر الاكروسوم يرتبط بالأحداث المعروفة (Cryocapacitation) عندما يحصل خروج للشحوم الفسفورية في سيولة الغشاء فستحدث التغييرات الشبيهة بالتكيف والتي تؤدي الى انتهاء مدة حياة النطف تتفق مع ما وجده (36)، بينما يرتبط كل من SOD وGPx وTAC ارتباط موجب مع نسبة النطف الحية وبالرغم من أن مضادات الأكسدة في سايتوبلازم النطفة قليلة وذلك لفقدانها خلال عملية نضج النطفة فأن زيادة الضرر في غشاء DNA الحيمن والمايتوكوندريا والذي يكون غير مؤقت وليس رجعي فأنها لا يمكنها اصلاح الضرر ويظهر الإجهاد التأكسدي عندما تتفوق عوامل الأكسدة على مضادات الأكسدة مما تؤدي الى فقدان النطف وقدرتها على الأخصاب (11) .

المصادر:

1- **Abdulkareem,T. A. (2014)** Influence of thawing period on some post-thaw semen characteristic of Holstein bulls following catalase addition to Tris extender. Al-anbar.J.Vet.Sci., 7:22-28.

2- **Agarwal,A.; Aponte-Mellado,A.; Premkumar,B. J.; Shaman,A.; and Gupta, S. (2012)**The effects of oxidative stress on female reproduction: Areview. Reproducetive biology and endocrinology.10:1-31.

3- **Akyash,F.; Talaei,T.; Esmaeilpour,T.; and Bahmanpour,S. (2009)** Effects of freezing and thawing on sperm plasma membrane glycoconjugates: A preliminary study. Cell J., 11 :1- 110.

4- **Albadry,K. I. (2012)**Effect of various thawing times and temperatures on frozen semen quality of friesisn bulls in Iraq. International Journal of animal and veterinary advances.4:384-388.

5- **Angélica,M.; Alejandra,J.; Germán, and Manuel.(2014)** Protective effect of resveratrol on biomarkers of oxidative stress induced by iron /ascorbate in mouse spermatozoa.nutrients.6:489-503.

6- **Apak,R.;Güclü,K.;Demerata,B.;Özyürek,M.;Celik,S.E.;Bektasoğlu,B.; Berker,K. I.;and Özyurt,D.(2007)** Comparative Evaluation of various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. Molecules,12:1496-1547.

7- **Bayejid, H.; Rakibul, I.; Feroza, B.; Yearul, K.; and Zakri, H. H. (2015)** Oxidative stress induced sperm DNA damage, apossible reason for male infertility.Iran J Repord Med Vol.13:525-532.

8- **Bilodeau, J. F.; Chatterjee, S.; Sirad, M. A.; and Gagnon, C. (2000)** Levelsof antioxidant defences are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing.Mol Reprod.,55:282-288.

9- **Bucak, M. N.; Ateşşahin, A.; Varışl, Ö.; Yüce, A.; Tekin, N.; Akçay,A. (2007)** The influence of trehalose,taurine systeamine and hyaluronan on ram semen microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. Science direct.Theriogenology.67:1060-1067.

10- **Büyükleblebici,S.; Tuncer,P. B.; Taşdemir,U.; Özgürtaş,T. Durmaz,E.; Büyükleblebici,O. (2014)**The Comparison of Three Different Cryoprotect- ants in Cryopreservation of Angora Goat Semen.Kafkas Univ.Vet.Fak Derg 20: 613-619.

11- **Castro,L.S. ;Assis,P.M.; Siqueira,A.F.P.;Hamilton.,T. R. S.; Mendes, C. M.;Losano,J.D. A.;Nichi,M.;Visintin,J. A.;andAssumpção, M. E. O. A. (2016)**Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: a dosede-pendent study model and a New and more sensitive oxidative status evaluation.Oxidative Medicine and Cellular Longevity.1–12.

12- **Castro,L.S.; Hamilton,T. R. S.; Mendes,C. M.; Nichi,M.; Barnabe,V. H.; Visintin,J. A.; and Assumpção, M. E. O. A. (2016)** Sperm cryodamage occurs after rapid freezing phase: flow cytometry approach and antioxidant enzymes activity at different stages of cryopreservation. J.of Animal Sci and Biotec.7: 1-9.

13- **Celeghini, E. C. C.; Arruda, R. P.; Andrade, A. F. C.; Nascimento, J.; Raphael, C. F.; and Rodrigues, P. H. M. (2008)** Effects that bovine sperm

cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. Animal Reproduction Science, 104, 119-131.

14- **Chatterjee,S.; and Gahgnon,C.(2001)** production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling,freezing and thawing.molecular reproduction and development.59:451-458.

15- **Duncan, D.B. 1955.** Multiple Rang and Multiple F-test.Biometrics.11:4-42.

16- **Gil-Guzman,E.; Ollero,M.; Lopez,M.C.; Sharma,R.K.; Alvarez,J.G.; Thomas , A.J.Jr.;and Agarwal,A. (2001)**Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. Hum Reprod 16:1922-1930.

17- **Gillan,L.; Evans,G.; and Maxwell,W.M.C. (1997)** Capacitation Status and Fertility of Fresh and Frozen-Thawed Ram Spermatozoa. Reproduction, Fertility and Development, 9:481-488.

18- **Guerriero, G.; Trocchia, S.; Abdel-Gawad, F. K.; and Ciarcia, G. (2014)** Roles of reactive oxygen species in the spermatogenesis regulation. Endocrinology.5:1-4.

19- **Günzler, A.; and Flohé, L. (1985)**Glutathione Peroxidase. In: Crc Handbook of Methods for Oxygen Radical Research CRC Press, Boca Raton, Fla.,285-290

20- **Guthrie, H. D.; and Welch, G. R. (2006)** Determination of Intracellular Reactive Oxygen Species and High Mitochondrial Membrane Potential in Percoll-treated Viable Boar Sperm Using Fluorescence Activated Flow Cytometry.Journal of Animal Science, 84: 2089-2100.

21- **Hsieh,Y. Y.; Chang,C. C.; and Lin,C. S. (2006)** Seminal malondialdehyde concentrationbut not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility. Int. J. of Biological Sci.2: 23-29.

22- **Keskes-Ammar,L.;Feki-Chakroun,N.;Rebai,T.;Sahnoun,Z.;Ghozzi,H.; and Hammami, S.; Zghal, K.; Fki, H.; Damak, J.; Bahloul, A. (2003)** Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men.Arch Androl.49:83-94.

23- **Khan,M.I.R. ; and Ijaz,A. (2008)**Effects of osmotic pressure on motility, plasma membrane integrity and viability in fresh and frozen thawed buffalo spermatozoa. Anim.Repord.sci,2:548-553.

24- **Khosrowbeygi,A.;Zarghami,N.;and Deldar,Y.(2004)**Correlation between Sperm Quality Parameters and Seminal Plasma Antioxidants Status. Iranian Journal of Reproductive Medicine.2:58-64.

25- **Madhuri,D.; Gupta,V.K.; Nema.S. P.; Patidar,A.; Shivhare,M.; Singh, and Shakya,V. (2012)** Modern semen evaluation tachniques in domestic animals: Areview. DHR inter.J.of Biomedical and live sciences.3:62-83.

26- **Mishra, S.; Kumar, R.; Malhotra, N.; Mohanty, K.; Pathak,V.; and Dada,R. (2014)** Oxidative damage to sperm DNA: Clinical implications. Andrology, 3:1-6.

27- **Muiño,R.;Rivera,M.; Rigau,T.; Rodriguez-Gil, J.; Peña, A. (2008)** Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. Anim Reprod Sci.,109: 50-64

28- **Nur,Z.; Sagirkaya, H.; Dogan, I.; Soylu, M. K.; AK,K.; Ileri,I. K. (2005)**Effect of low temperature thawing procedure and post-thaw cold shock on frozen bull semen.Medycyna Wet.,61:991-993.

29- **Peskin,A. V.; and Winterbourn,C. C. (2000)**A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1).Clinica Chimica Acta 293:157–166.

30- **Rastegarnia,A.;Shahverdi,A.;Topraggaleh,T.R.;Ebrahimi,B.;Shafipour,V. (2013)** Effect of different thawing rates on post- Thawviability, kinematic parameters and chromatin structure of buffalo (Bubalusbubalis) Spermatozoa. Cell Journal (Yakhteh),Vol 14: 306-313.

31- **Sarıözkan, S.; Bucak, M. N.; Tuncer, P. B.; Ulutaş, P. A¸; and Bilgen, A. (2009)** The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. Cryobiology,58: 134-138.

32- **SAS.(2012)** Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA.

33- **Shen,J.;Deininger,P.;Hunt,J.D.;Zhao,H. (2007)** 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine (8-OH-Dg) as apotential survival biomarkers in patients with non-small cell lung cancer.Cancer; 109: 574-580.

34- **Simões,R.; Feitosa,W. B.; Siqueira,A. F. P.; Nichi,M.; Paula-Lopes,F. F.; Marques, M. G.; Peres, M. A.; Barnabe, V. H.; Visintin, J. A.; and Assumpção, M. E. O. (2013)**Influence of bovine sperm DNA fragmen-

tation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome. Reproduction.146:433-441.

35- **Süleyman,B.; and Kemal,A. K. (2007)**The effects of thawing time,post-thawed thermal applications and resistance test on semen characteristics in bulls. J. Fac. Vet. Med. Istanbul. univ.,33:12-22.

36- **Taşdemir,U.;Tuncer,P. B.; Büyükleblebici, S.; Özgürtaş, T.; Durmaz, E.; and Büyükleblebici, O. (2014)** Effects of various antioxidants on cryopreserved bull sperm quality. Kafkas Univ Vet Fak Derg,20: 253-258.

37- **Tavilani,H.;Goodarzi,M.T.;Vaisiraygani,A.;Salimi,S.;Hassanzadeh,T. (2008)** Activity of antioxidant enzymes in seminal plasma and their relationship with lipid peroxidation of spermatozoa.International Braz J.Urol.34:485-491.

38- **Thomson, L. K.; Fleming, S. D; Aitken, R. J.; DeIuliis,G. N.; Zieschang, J. A.; Clark, A. M. (2009)** Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is pre- dominantlymediated by oxidative stress rather than apoptosis. Human Reprod- uction. 24:2061–2070.

39- **Tuncer,P. B.; Bucak,M. N.; Sarıözkan,S.; Sakin,F.; Yeni,D.; Ciğerci,İH.; Ateşşahin,A.; Avdatek,F.; Gündoğan,M.; and Büyükleblebici,O. (2010)** The effect of raffinose and methionine on frozen/thawed Angora buck (Capra hircus ancryrensis) semen quality, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities. Cryobiology, 61: 89-93.

40- **Tvrda, E.; Kňažická, Z.; Bárdos, L.; Massányi, P.; and Lukáč, N. (2011)** Impact of oxidative stress on male fertility areview.Acta veterinaria hungarica 59 :465-484.

41- **Vishwanath R. (2003)** Artificial insemination: the state of the art. Theriogenology,59:571-584.

42- **Yagi, K. (1998)** simple procedure for specific assay of lipidhydroperoxides. In semen or plasma.methodin Molicularbiology.108:107-110.

43- **Zeitoun, M. M., and Al-Damegh. M. A. (2015)** Effect of Nonenzymatic Antioxi- dants on Sperm Motility and Survival Relative to Free Radicals and Antioxidant Enzymes of Chilled-Stored Ram Semen.Open Journal of Animal Sciences,5:50-58.