تأثير إضافة المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل *Melissa officinalis* وبعض مضادات الأكسدة الأخرى إلى مخفف Tris في النسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي واكروسوم نطف ثيران الهولشتاين بعد 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 إلى مخفف Tris في النسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي واكروسوم نطف ثيران الهولشتاين 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 واحدة أسبوعياً وإجراء الفحوصات الروتينية على كل قذفة، ومن ثم تم تجميعه للثيران جميعها (Pooled semen) وتقسيمه بالتساوي على المجاميع العشرة المختلفة ضمن التجربة الواحدة. أضيف إلى المجموعة الأولى (A1) مخفف Tris فقط وعَدت بمثابة مجموعة سيطرة، في الوقت الذي أضيف مع مخفف Tris 0.062 ملغم/ 100 مل من المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل في المجموعة الثانية (A2)، 0.062 ملغم/ 100 مل 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 النسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي واكروسوم النطف لثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتبريد عند درجة حرارة 5°م والتجميد بعد 48 ساعة وشهر وشهرين وثلاثة اشهر. بينت نتائج التجربة ان إضافة المستخلص المائي لأوراق حشيشة النحل ضمن المجموعة A2 أدى إلى زيادة معنوية ($P \leq 0.01$) في النسب المئوية لكل من سلامة الغشاء وسلامة الاكروسوم مقارنةً بمجموعة السيطرة A_1 لكافة مدد الحفظ بالتبريد والتجميد. أدت إضافة خليط من المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل وأنزيم الكاتليز في المجموعة A5 إلى زيادة كل من النسب المئوية لسلامة الغشاء البلازمي والاكروسوم لمدد مختلفة من الحفظ بالتجميد قياساً بمجموعة السيطرة. من جانب آخر، 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 النسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي واكروسوم النطف وبشكل متميز 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 Tris كان له دور فعال في تحسين النسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي واكروسوم النطف 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 لحشيشه النحل، مضادات أكسدة، النسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي وكروسوم النطف، ثيران الهولشتاين.

e-mail: talal200320032000@yahoo.com

[1] البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الثاني

Effect of adding aqueous extract of *Melissa officinalis* leaves and some other antioxidants to Tris extender on post-cooling and post-cryopreservative plasma membrane and acrosome integrity percentages 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 to Tris extender on sperm's plasma membrane and acrosome integrity 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 using Tris extender. In this experiment, AEMOL (0.062mg/100 ml; A2), WEMOL (0.062mg/100 ml) + 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) and comparisons in response were made with the control group (Tris extender, A_1). The effect of these additives on semen characteristics of Holstein bulls for different preservation periods (cooling at 5◦C, 48 h, 1, 2 and 3 months post cryopreservation, PC) were studied. The A2 group exhibited greater ($P \leq 0.01$) plasma membrane and acrosome integrity percentage as compared with A1 group at all preservation time periods. Greater ($P \leq 0.01$) plasma membrane and acrosome integrity percentage were noticed in comparison with the A1 group at all preservation time periods. On the other hand, A5 group exhibited greater ($P \leq 0.01$) plasma membrane and acrosome integrity percentage, as well as, Adding of vitamin E alone (A9) or combined with AEMOL (A10) to Tris extender had positive ($P \leq 0.01$) effect in improving all the semen characteristics at all preservation time periods. In conclusion, adding of AEMOL as alone or combined with the other synthetic antioxidants to Tris extenders had a crucial role in improving PC sperm's plasma membrane and acrosome integrity percentage of Holstein bulls. This was reflected positively in increasing pregnancy rates of the inseminated cows and owner's income consequently.

Key words: Aqueous extract of *Melissa officinalis* leaves, antioxidants, Sperm's plasma membrane and acrosome integrity, Holstein bulls.

المقدمة

تعد عملية تجميد السائل المنوي للثيران من التقانات الحيوية التي أسهمت في تحسين الأبقار عالمياً 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 الذكور ومنها الثيران (2). وتؤدي عملية الحفظ بالتجميد في معظم الذكور ومنها الثيران بإنتاج أنواع الأوكسجين التفاعلي(Reaction oxygen species, ROS) التي تلعب دوراً كبيراً في أكسدة الدهون Lipid peroxidation (LPO) لأغشية النطفة وتحطم المادة الوراثية DNA damage، وبالتالي 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 Flavinouds وهي مركبات طبيعية متعددة الفينول (7، 8، 9) تعمل فضلاً عن دورها كمضادات للأكسدة تعمل في السيطرة على الفطريات والبكتيريا والفيروسات ومانعة لحدوث الإصابة بالسرطان (10، 11 ، 12). ويعد نبات حشيشة النحل *Melissa officinalis* من النباتات العشبية المعمرة والتي تعود 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)، إذ أظهرت فعالية كبيرة كمضاد للأكسدة نظراً لاحتوائه على كميات كبيرة من الفلافونيدات والانثوسيانيدات (14، 15، 16) فضلاً عن تأثيراته المضادة للبكتريا والفيروسات (17). كما ويعد فيتامين C من مضادات الأكسدة غير الأنزيمية الفعالة التي تعمل على إزالة الجذور الحرة، 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 Tris دوراً في زيادة العدد الكلي للنطف ذات الأكروسوم السليم عند كافة مدد الحفظ المختلفة لنطف ثيران الهولشتاين(22). وقد جرت محاولات عديدة لإضافة أنواع عديدة من مضادات الأكسدة إلى مخففات السائل المنوي وتأثيراتها في تحسين نوعية السائل المنوي بعد الحفظ بالتجميد لدى ثيران الهولشتاين في العراق (22، 27، 28، 29، 30، 31)، 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 إلى مخفف Tris في النسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي والاكروسوم 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 إجراء 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 التركيز استنادا لما جاء به (35) مع بعض التحويرات التي أجراها (36). استعملت تراكيز مختلفة من حامض الكاليك لتحديد المنحنى القياسي، 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 بأعمار تتراوح بين 2.5- 3 سنوات وبوزن جسم يتراوح بين 500-750 كغم. تم جمع السائل المنوي بطريقة المهبل الاصطناعي وكانت جميع الثيران لا تعاني من مشاكل صحية أو تناسلية. بعد جمع السائل المنوي من كل ثور تنقل كل قذفة إلى حمام مائي على درجة حرارة 37مْ لحين احتساب النسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي وسلامة اكروسوم النطف. استمر جمع السائل المنوي من الثيران لمدة سبعة أسابيع.
- تقييم وحفظ السائل المنوي والمعاملات: أجريت الفحوصات الروتينية على السائل المنوي المجمع حديثاً (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 باستخدام مخفف Tris، وقد تضمنت التجربة المجاميع الآتية: المجموعة الأولى (A1): مجموعة السيطرة والتي تضمنت إضافة السائل المنوي الطازج إلى مخفف Tris فقط. المجموعة الثانية (A2): تضمنت إضافة السائل المنوي الطازج إلى مخفف Tris الحاوي 0.062 ملغم/ 100 مل من المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل. المجموعة الثالثة (A3): تضمنت إضافة السائل المنوي الطازج إلى مخفف Tris 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 Tris الحاوي 0.062 ملغم/ 100 مل من المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل+ 0.05 مليمول من مركب Trolox, Sigma- Aldrich, USA وهو المشابه الصناعي لفيتامين E. المجموعة الخامسة (A5): تضمنت إضافة السائل المنوي الطازج إلى مخفف Tris 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 Tris + إنزيم الكاتليز (100 وحدة دولية/ مل، Sigma–Aldrich, USA). المجموعة السابعة (A7): تضمنت إضافة السائل المنوي الطازج إلى مخفف Tris + فيتامين C ;5 مليمول/ مل (L-Ascorbic acid, SCR,China). المجموعة الثامنة (A8): تضمنت إضافة السائل المنوي الطازج إلى مخفف Tris +0.05 مليمول من مركب Trolox, Sigma- Aldrich, USA وهو المشابه الصناعي لفيتامين E). المجموعة التاسعة (A9): تضمنت إضافة السائل المنوي الطازج إلى مخفف Tris + فيتامين E (0.2 مليمول/ مل، α-Tocopherol BDH, England). المجموعة العاشرة (A10): تضمنت إضافة السائل المنوي الطازج إلى مخفف Tris 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 للنطف ذات الغشاء البلازمي السليم على وفق طريقة (37)، وسلامة الاكروسوم وفق طريقة (38).

- التحليل الإحصائي: اجري التحليل الإحصائي للنتائج باستخدام البرنامج الإحصائي (39) باستعمال تصميم عشوائي كامل (CRD) وفق 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.

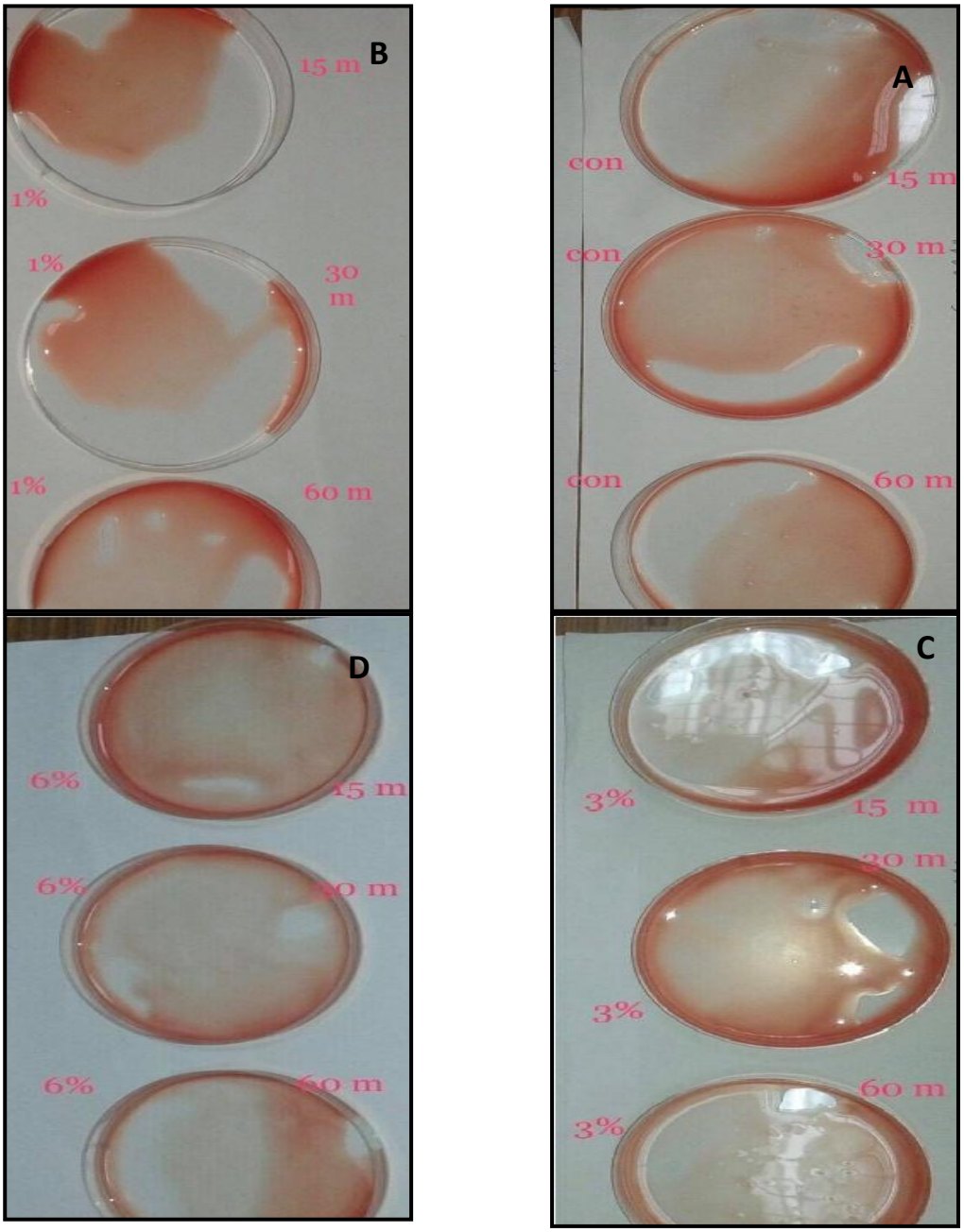
e_{ijk} = الخطأ القياسي.

قورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باستعمال اختبار دنكن متعدد الحدود(40).

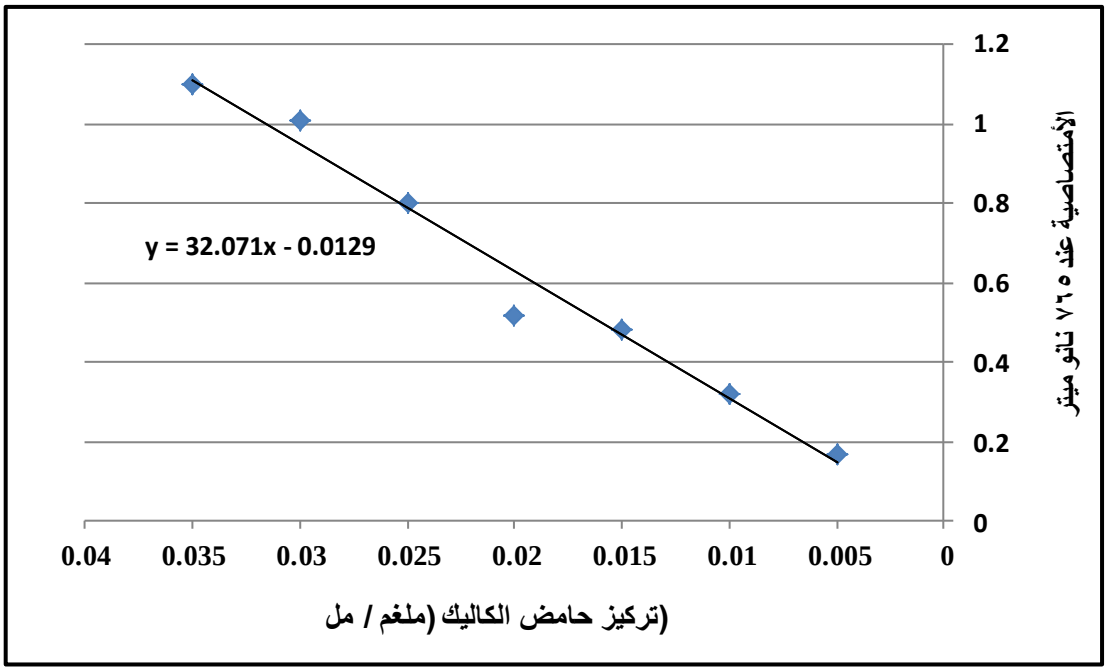
النتائج

- **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 (2A, 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 1) 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 الحاليك/ غم من المستخلص.
- **النسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي للنطف:** أشارت النتائج إلى وجود زيادة معنوية ($P\leq0.01$) في النسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي للنطف لدى المجموعتين A5 وA10 مقارنة ببقية المجاميع قيد الدراسة، باستثناء المجموعة A9 والتي لم تختلف معهما معنوياً عند الحفظ بالتبريد، في حين سجلت المجموعة A8 اقل قيمة للصفة والمدة ذاتهما بلغت 53.84±0.92% (جدول 1). واستمر التفوق المعنوي($P\leq0.01$) للمجموعتين A5 وA10 في النسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي للنطف بعد 48 ساعة من الحفظ بالتجميد على بقية المجاميع باستثناء المجموعة A9 التي لم تختلف معهما معنوياً من جهة ومع المجاميع B2، B6 وB7 من جهة أخرى (جدول1). أظهرت المجموعة A5 أعلى ($P\leq0.01$) نسبة مئوية لسلامة الغشاء البلازمي للنطف بلغت 69.51 ± 0.58% مقارنة بالمجاميع الأخرى المدروسة بعد مرور شهر من الحفظ بالتجميد، باستثناء المجموعتين A9 وA10 واللتان لم تختلفا معها معنوياً، في الوقت الذي سجلت فيه المجموعة A8 أوطأ القيم (45.49 ± 1.23%) بعد مرور شهر من الحفظ بالتجميد (جدول1). وضمن السياق نفسه، سجلت المجموعتان A5 وA9 أعلى ($P\leq 0.01$) نسبة مئوية لسلامة الغشاء البلازمي للنطف قياساً ببقية المجاميع الأخرى قيد الدراسة بعد الشهر الثاني من الحفظ بالتجميد باستثناء المجاميع B2، B6 وB10 والتي لم تختلف فيما بينها (جدول 1). كما أظهرت نتائج الشهر الثالث من الحفظ بالتجميد تفوق كلاً من المجاميع A5، A6 وA9 معنوياً ($P\leq0.01$) بالمقارنة مع بقية مجاميع الدراسة، في الوقت الذي لم تختلف المجموعة A2 معنوياً معهم. من جانب آخر، سجلت كل من المجاميع A1، A4 وA8 أوطأ القيم للصفة والمدة ذاتها (جدول 1). كما بينت نتائج مدد الحفظ

المختلفة للنسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي للنطف تفوق المجاميع A1، A4، A5، A7 وA8 معنوياً ($P \leq 0.01$) لمدة التبريد مقارنة ببقية مدد الحفظ بالتجميد (جدول 1)، مع وجود تفوق معنوي ($P \leq 0.05$) للمجموعتين A2 وA6 لمدد الحفظ بالتبريد مقارنة بالشهرين الثاني والثالث من الحفظ بالتجميد وضمن المجموعة الواحدة وللصفة نفسها (جدول 1). وعند المقارنة بين مدد الحفظ المختلفة ضمن المجموعة الواحدة، تفوقت ($P \leq 0.01$، $P \leq 0.05$) مدة الحفظ بالتبريد على بقية مدد الحفظ بالتجميد في النسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي لدى المجاميع A1، A2، A4، A5، A6، A7 وA8 مع انعدام الفروق المعنوية بين مدد الحفظ بالتجميد المختلفة لدى تلك المجاميع. ولم تكن هنالك فروق معنوية بين مدد الحفظ لدى المجاميع A3، A9 وA10 (جدول 1).



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 لسلامة اكروسوم النطف:** أشارت النتائج إلى تفوق المجموعتين A5 (81.39 ± 1.17 و76.68± 1.12%) وA10 (81.68 ± 2.43 و78.68 ± 2.42%) معنوياً (P≤0.01) في النسبة المئوية لسلامة اكروسوم النطف خلال مدتي الحفظ بالتبريد و48 ساعة بعد الحفظ بالتجميد على التوالي مقارنة ببقية المجاميع (جدول 2). وفي السياق ذاته، شهدت نتائج الأشهر الثلاثة من الحفظ بعد التجميد تفوق المجموعة A10 معنوياً (P ≤ 0.01) على بقية المجاميع قيد الدراسة، في الوقت الذي سجلت فيه المجموعة B8 أوطأ قيمة لدى المجاميع خلال الأشهر الثلاثة من الحفظ بالتجميد للصفة نفسها (جدول 2). وعند المقارنة بين مدد الحفظ المختلفة ضمن المجموعة الواحدة، أظهرت النتائج تفوق مدة التبريد معنوياً (P≤0.01، P≤ 0.05) على مدد الحفظ بالتجميد بعد مرور الأشهر الأول والثاني والثالث لدى المجاميع A1– A9، في الوقت الذي لم تختلف فيه مدد الحفظ المختلفة ضمن المجموعة A10 (جدول 2). وباستثناء المجموعتين A5 وA8 والتي انخفضت فيهما معنوياً النسبة المئوية لسلامة الاكروسوم النطف بعد مرور 48 ساعة من الحفظ بالتجميد مقارنة بالتبريد، لم تختلف مدتي الحفظ فيما بينها معنوياً ضمن المجاميع A1، A2، A3، A4، A6، A7 وA9 (جدول 2).

جدول (1) تأثير إضافة المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل وبعض مضادات الأكسدة الأخرى وخليطهم الى مخفف Tris في النسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي للنطف 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	$60.08 \pm 1.17^{A\,d}$	$56.49 \pm 1.05^{B\,e}$	$53.73 \pm 1.10^{BC\,d}$	$51.00 \pm 0.93^{C\,e}$	$47.32 \pm 1.45^{D\,d}$	P ≤ 0.01
A2	$68.83 \pm 1.37^{A\,b}$	$64.17 \pm 1.56^{AB\,bc}$	$63.59 \pm 1.94^{AB\,bc}$	$62.40 \pm 2.07^{B\,abc}$	$61.97 \pm 2.20^{B\,abc}$	P ≤ 0.05
A3	$66.70 \pm 1.70^{A\,cd}$	$62.62 \pm 1.79^{A\,cd}$	$61.08 \pm 2.45^{A\,bc}$	$59.20 \pm 3.48^{A\,bcd}$	$58.83 \pm 3.59^{A\,bc}$	N.S
A4	$63.84 \pm 1.78^{A\,cd}$	$58.99 \pm 1.77^{AB\,de}$	$57.62 \pm 2.38^{B\,cd}$	$54.62 \pm 1.20^{B\,de}$	$47.28 \pm 1.28^{B\,d}$	P ≤ 0.01
A5	$73.84 \pm 1.749^{A\,a}$	$70.20 \pm 1.10^{B\,a}$	$69.51 \pm 0.58^{B\,a}$	$66.77 \pm 0.98^{BC\,a}$	$65.68 \pm 1.08^{C\,a}$	P ≤ 0.01
A6	$69.41 \pm 0.96^{A\,b}$	$64.48 \pm 1.91^{AB\,bc}$	$62.23 \pm 2.19^{AB\,bc}$	$62.62 \pm 2.28^{B\,abc}$	$66.97 \pm 1.82^{B\,a}$	P ≤ 0.05
A7	$66.84 \pm 1.27^{A\,bc}$	$63.48 \pm 1.78^{AB\,bc}$	$60.18 \pm 1.88^{BC\,c}$	$57.62 \pm 2.40^{C\,cd}$	$56.40 \pm 1.87^{C\,c}$	P ≤ 0.01
A8	$53.84 \pm 0.92^{A\,e}$	$49.20 \pm 1.18^{B\,f}$	$45.94 \pm 1.23^{BC\,e}$	$43.62 \pm 0.71^{C\,f}$	$43.40 \pm 0.70^{C\,d}$	P ≤ 0.01
A9	$70.70 \pm 1.22^{A\,ab}$	$67.34 \pm 0.88^{A\,ab}$	$67.08 \pm 1.38^{A\,ab}$	$66.48 \pm 1.31^{A\,a}$	$68.68 \pm 1.85^{A\,a}$	N.S
A10	$74.56 \pm 1.55^{A\,a}$	$70.34 \pm 1.29^{AB\,a}$	$67.08 \pm 2.82^{AB\,ab}$	$65.34 \pm 4.00^{B\,ab}$	$64.26 \pm 3.90^{B\,bc}$	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 معنوي

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

المعاملة	المدة					مستوى المعنوية
	بعد التبريد 5 م	بعد 48 ساعة	بعد شهر	بعد شهرين	بعد ثلاث شهور	
A1	$^{A\ bc}$ 69.41 ± 1.06	$^{AB\ bc}$ 66.51 ± 1.20	$^{BC\ cd}$ 64.14 ± 1.27	$^{C\ d}$ 61.07 ± 0.96	$^{D\ e}$ 57.51 ± 0.82	P ≤ 0.01
A2	$^{A\ b}$ 72.18 ± 1.56	$^{AB\ bc}$ 69.25 ± 2.15	$^{AB\ bc}$ 68.08 ± 2.24	$^{AB\ bc}$ 67.64 ± 2.26	$^{B\ bcd}$ 63.86 ± 1.76	P ≤ 0.05
A3	$^{A\ bc}$ 71.39 ± 1.16	$^{AB\ bc}$ 68.11 ± 1.54	$^{B\ cd}$ 65.54 ± 1.69	$^{B\ bcd}$ 65.14 ± 1.96	$^{B\ bcd}$ 64.92 ± 2.16	P ≤ 0.05
A4	$^{A\ c}$ 67.54 ± 0.77	$^{AB\ c}$ 64.72 ± 0.89	$^{BC\ d}$ 62.19 ± 1.01	$^{C\ d}$ 60.58 ± 0.85	$^{C\ de}$ 60.45 ± 1.70	P ≤ 0.01
A5	$^{A\ a}$ 81.39 ± 1.17	$^{B\ a}$ 76.68 ± 1.12	$^{C\ b}$ 72.28 ± 0.86	$^{D\ b}$ 68.86 ± 0.76	$^{D\ b}$ 67.77 ± 1.16	P ≤ 0.01
A6	$^{A\ b}$ 73.11 ± 1.42	$^{AB\ bc}$ 69.54 ± 1.90	$^{B\ cd}$ 66.11 ± 1.81	$^{B\ bcd}$ 65.14 ± 1.96	$^{B\ bcd}$ 64.92 ± 2.16	P ≤ 0.01
A7	$^{A\ bc}$ 71.25 ± 1.06	$^{AB\ bc}$ 67.68 ± 1.12	$^{BC\ cd}$ 64.96 ± 1.32	$^{C\ cd}$ 63.14 ± 1.37	$^{C\ cde}$ 62.06 ± 1.83	P ≤ 0.01
A8	$^{A\ d}$ 52.96 ± 0.72	$^{B\ d}$ 50.97 ± 0.43	$^{B\ e}$ 50.82 ± 0.52	$^{B\ e}$ 50.14 ± 0.49	$^{B\ f}$ 49.63 ± 0.65	P ≤ 0.01
A9	$^{A\ b}$ 72.96 ± 1.45	$^{AB\ b}$ 70.68 ± 1.44	$^{B\ bc}$ 68.39 ± 1.05	$^{B\ cd}$ 67.00 ± 1.46	$^{B\ bc}$ 67.06 ± 1.44	P ≤ 0.01
A10	$^{A\ a}$ 81.68 ± 2.43	$^{A\ a}$ 78.68 ± 2.42	$^{A\ a}$ 77.39 ± 2.31	$^{A\ a}$ 76.57 ± 2.56	$^{A\ a}$ 75.20 ± 2.04	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

- المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل: 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% (41) اعتماداً على نوع النبات والجزء النباتي المدروس والمذيب المستخدم في عملية الاستخلاص، فقد حصلت (42) 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 (41) 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 (43) 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 (44، 45). 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.
- النسبة المئوية لسلامة الغشاء واكروسوم النطف: ان النتائج المتميزة للمجموعة A2 (مخفف Tris+ 0.062 ملغم/ 100 مل من المستخلص المائي لأوراق حشيشة النحل) من خلال تحسن كل من النسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي وسلامة الاكروسوم، لدى ثيران الهولشتاين مقارنةً بمجموعة السيطرة (A1) خلال مدد الحفظ بالتبريد والتجميد المختلفة، قد يعود إلى الفعالية العالية للمستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل كمضاد طبيعي فعال للأكسدة (Powerful antioxidant) وكبح نشاط الجذور الحرة التي تتولد بكميات كبيرة خلال مراحل حفظ النطف بالتجميد نتيجة اختراق مركب بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) للغشاء البلازمي للنطفة وتثبيط فعالية بعض الأنزيمات الحيوية (Vital enzymes) ومهاجمة الحوامض الدهنية غير المشبعة المتعددة (Polyunsaturated fatty acids; PUFFA) لغشاء النطفة (3، 6) من خلال احتواء المستخلص المائي على تراكيز عالية من المركبات الفينولية وخصوصاً مركب Rosmarinic acid (46). وقد بين (47) في دراسة أجريت لبيان فعالية الفلافونويدات المستخلصة من النباتات كمواد مضادة للأكسدة، ان مجاميع الهيدروكسيل (OH – groups) 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، 48، 49)، وبالتالي فأن كبح هذه الجذور الحرة يؤدي إلى منع تكوين البيروكسيدات المسببة للتأكسد أو تحطيم الجذور الحرة المتكونة (50). وقد اتفقت نتائجنا بإضافة المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل إلى مخفف Tris في تحسين النسبة المئوية لسلامة الأغشية للنطف مع ما وجده (51) 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 وهذا ما قد يفسر التفوق الحاصل في النسبة المئوية لسلامة الأغشية البلازمية للنطف الثيران المجموعة A2 في الدراسة الحالية، فضلاً عن ذلك فأن المركبات الفينولية في المستخلص المائي للنبات قد يلعب دوراً في منع أكسدة الأحماض الدهنية غير المشبعة الموجودة في أغشية النطف من خلال منع إنتاج أنواع الأوكسجين التفاعلي ومنع حدوث عملية بيروكسدة الدهن ومناطق تكوين الطاقة ضمن المايتوكندريا عن طريق التفاعل مع الجذور الحرة (52، 53) وخفض تركيز المالون الديهايد في البلازما المنوية (54). وهذا ما يؤكد ما جاءت به النتائج الحالية في زيادة النسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي وسلامة اكروسوم النطف. إن إضافة المستخلص المائي لأوراق نبات حشيشة النحل كمضاد أكسدة طبيعي إلى مخفف Tris سواء 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، وان تباين مضادات الأكسدة في فعاليتها لزيادة ثبات الأحماض الدهنية وكذلك تباين مواقع توزيعها داخل الخلية وطريقة تأثيرها والحد من الأضرار الناشئة من أنواع الأوكسجين التفاعلي قد شجع على استعمال خليط لتلك المضادات مع بعضها البعض، كما وجد في الآونة الأخيرة ان إضافة مضادات الأكسدة المختلفة على شكل توليفات (Combinations) تحسن من خصائص النطف لدى الرجال (55 ،56). فضلاً عن ذلك فأن هناك مواد أخرى لها 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 (57). وقد يرجع التحسن المعنوي ($P\leq0.01$) الواضح للنسبة المئوية لسلامة غشاء واكروسوم النطف لثيران الهولشتاين لدى المجموعتين A5 (مخفف Tris+ 0.062 ملغم/ 100مل من المستخلص المائي لأوراق حشيشة النحل+ 100 وحدة دولية أنزيم الكاتليز) وA10 (مخفف Tris+ 0.062 ملغم/ 100 مل 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 (58)، إذ أن جزئية واحدة من أنزيم الكاتليز لها القدرة على تفكيك 2 مليون جزئية من H_2O_2 في الدقيقة الواحدة بالإضافة إلى دوره في الحد من نشاط أنزيم NADPH Oxidase مما يقلل من أنتاج جذر (O.-2) (59، 60، 61، 62)، 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 (63). من ناحيةٍ أخرى، يعد فيتامين E من المركبات الذائبة في الدهن(64)، 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). من جانب آخر، يعمل 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 (65) التي تعمل على حماية الكولسترول والأحماض الدهنية (66، 67). كان لإضافة فيتامين E بتركيز 0.02 ملي مول إلى مخفف Tris (A9) تأثيراً واضحاً ($P\leq0.01$) في تحسين الصفتين المدروستين خلال مدد مختلفة من الحفظ

بالتجميد والمتمثلةً بزيادة النسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي عند الحفظ بالتبريد والنسبة المئوية لسلامة الاكروسوم طيلة مدد الحفظ في الدراسة. إن هذا التفوق ربما يعود إلى أن فيتامين E يعد كمضاد أكسدة يعمل على حماية الكولسترول والأحماض الدهنية غير المشبعة في غشاء النطفة، إذ يقوم بعملية كسر سلسلة تفاعلات تكوين الجذور الحرة من خلال كبحه لجذور O_2^- و OH^- و ROO^- والجذور الحرة الناتجة من أكسدة الدهون عن طريق منحه ذرة هيدروجين لإنتاج مركبات أكثر استقراراً وبالتالي العمل على توقف تضاعف الجذور الحرة وتقليل أضرار هذه الجذور مما يؤدي إلى تحسين صفات السائل المنوي للثيران (66، 67). كان لإضافة مركب Trolox (0.08 ملي مول) في المجموعة A8 عدم ظهور تحسن معنوي في النسبة المئوية لحركة النطف الفردية، على الرغم من كون مركب Trolox وهو الشبيه الصناعي (Analogue) لفيتامين E القادر على الذوبان في الماء يعد 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 (68، 69، 70). ولم تتفق النتائج الحالية مع ما توصل إليه (71) لدى الكباش و(69، 72) لدى الخنازير في دور مركب Trolox في تحسن صفات السائل المنوي لدى هذين النوعين من الحيوانات الزراعية. ان سبب عدم الاتفاق ربما 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 Tris (A7) لدى نطف ثيران الهولشتاين، عدم تحسن الصفات الأخرى. ولم تتفق نتائجنا الحالية مع ما توصل إليه (73). ان سبب عدم الاتفاق ربما 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 أو إلى سوء عملية خزن ونقل المواد والظروف المرافقة لها. كما كان لإضافة إنزيم الكاتليز بتركيز 100 وحدة دولية/ مل إلى مخفف Tris (A6) لنطف ثيران الهولشتاين أثراً في حدوث تحسن معنوي واضح في النسبة المئوية لكل من سلامة الغشاء البلازمي وسلامة الاكروسوم 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 (58).

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. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Duh, P. D. & Yen, G. C. (1997). Antioxidative activity of three herbal water extracts. Food Chem., 60 (4): 639-645.
33. 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.
34. Donaldson, K.; Stone, V.; Tran, C.; Kreyling, W. & Borm, P. (2004). Nanotoxicology. Occup. Envirn. Med., 61(9): 727-728.
35. Singleton, V. L. & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Viticult., 16: 144-158.
36. 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.
37. Jeyendran, R. S.; Van der Ven, H. H.; Perez-Pelaez, M.; Crabo, B. G. & Zaneveld, L. J. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J. Reprod. Fertil., 70(1): 219- 228.
38. Hancock, J. L. (1952). The morphology of bull spermatozoa. J. Exp. Biol., 29: 445-453.
39. SAS. (2012). SAS/STAT User's Guide for Personal Computers. Release 9.1 SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA.
40. Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F. Tests. Biometrics. 11: 1-42.
41. 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.

42. 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.

43. 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.
44. 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.
45. Rassouli, M. B.; Ghayour, N.; Afsharian, M.; Tehranipour, M. & Ghayour, B. M. (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.
46. Sareh, R.; Zeinab, M.; Morteza, B. R. & Nargess, G. (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.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. Desai, N. R.; Mahfouz, R.; Sharma, R.; Gupta, S. & Agarwal, A. (2010). Reactive oxygen species levels are independent of sperm concentration, motility, and abstinence in a normal, healthy, proven fertile man: a longitudinal study. Fertil. Steril., 94(4): 1541-1543.
53. Bansal, A. K. & Bilaspuri, G. S. (2011). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Vet. Med. Int., 2011:1-7.
54. Khudiar, K. K. (2000). The role of aqueous extracts of olive Olea europaea leaves and garlic *Allium sativum* in ameliorating the effect of experimentally induced Atherosclerosis in rate. Ph.D. Thesis, College of Veterinary Medicine. University of Baghdad.
55. 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.
56. 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.
57. Owen, R. F. (1976). Principles of Food Science Part 1: Food Chemistry, Marcel Dekker, New York.
58. Caballero, B. M. D. (2007). Antioxidant Nutrients. PhD Thesis. Johns Hopkins University, USA.

59. 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.
60. Martin, D. W.; Mayes, P. A. & Rodweel, V. W. (1983). Harper's Review of Biochemistry. 18th ed., Lang Medical Publications. Lebanon. P. 128.
61. 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.
62. Agarwal, A.; Prabakaran, S. A. & Said, T. M. (2005). Prevention of oxidative stress injury to sperm. J. Androl., 26(6): 654- 660.
63. 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.
64. Traber, M. G. (1999). Utilization of vitamin E. Biofactors, 10(2-3): 115-120.
65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. 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.