تقييم فاعلية استخدام الليبوبروتينات منخفضة الكثافة (LDL) في محلول تمديد محلي لتجميد السائل المنوي لكباش العواس السورية

Evaluation the Efficiency of Using Low Density Lipoproteins (LDL) in Local Extender for Freezing Semen of Syrian Awassi Rams

م. محمد باشاوات[1] أ. د. محمد ربيع المرستاني[1] د. محمد موسى[2] أ.د. دانيال تنتورييه [3]

Bashawat M [1] M. R. Al-Merestani[2] M. Moussa[2] D. Tainturier[3]

(1) قسم الإنتاج الحيواني، كلية الزراعة، جامعة دمشق-سورية.

(1) Dep. of Animal Production, Faculty of Agriculture, University of Damascus- Syria.

(2) أستاذ مساعد في قسم الجراحة والولادة، كلية الطب البيطري، جامعة البعث-حماة-سورية.

(2) Professor Assistant in Department of Surgery and Obstetrics ،Faculty of Veterinary Medecine – University of Al-Baath, Hama, Syria.

(3) بروفسور في المدرسة الوطنية للطب البيطري، قسم التناسليات، جامعة نانت، نانت، فرنسا.

(3) Ecole Nationale Veterinarie de Nantes, Nante, France.

الملَخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم فاعلية استخدام ثلاثة تراكيز من الليبوبروتينات منخفضة الكثافة (LDL) بديلاً عن صفار البيض الكامل في محلول تمديد محلي التحضير للسائل المنوي لذكور أغنام العواس. نفذ البحث في محطة بحوث ازرع التابعة للمركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة –اكساد خلال الموسم التناسلي لعام 2012،استخدمت أربعة كباش من عرق العواس بعمر ثلاث سنوات، لجمع السائل المنوي بمعدل ثلاث مرات في الأسبوع وبإيقاع قذفتين في كل مرة واستخدمت عدة محاليل تمديد، الأول محلول AndroMed الذي اعتمد كمحلول شاهد أجنبي، والثاني محلول سترات الصوديوم مع صفار بيض كامل (20%) واعتمد كمحلول شاهد محلي، وفي المحاليل الثلاثة الأخرى استبدل صفار البيض الكامل بثلاثة تراكيز مختلفة من جزيئات LDL (6% و8% و10%) على التوالي. قُيمت حيوية النطف مجهرياً باستخدام مجهر تباين الأطوار وقدرت نسبة النطف الحية والميتة باستخدام صبغة ايوزين- نيكروزين القياسية، كما استخدم جهاز تحليل السائل المنوي بمساعدة الحاسوب (CASA) لتقييم مؤشرات الحركية للنطف إلكترونيا بعد الإذابة.
أظهرت النتائج أن النطف الحية في محلول التمديد LDL 8% كانت أعلى ومتفوقة معنويا (P<0.001) مقارنة مع بقية محاليل التمديد المختبرة، حيث بلغ متوسط النطف الحية بعد التبريد 73% في محلول LDL (8%) مقابل 70.66% و67.77% و68.71% و68.6% في محاليل الشاهد القياسي والشاهد المحلي وLDL (6%) وLDL (10%) على التوالي، كما انخفضت نسبة النطف الحية بعد التجميد والإذابة الى 62.66% في محلول LDL (8%) مقارنة مع 60.66% و54.18% و51.00% و56.40% في محاليل الشاهد القياسي، الشاهد المحلي، LDL (6%) وLDL (10%) على التوالي. وأظهرت نتائج التحليل باستخدام جهاز CASA بعد إزالة التجميد تفوقا عالي المعنوية (P<0.001) لمحلول LDL (8%) مقارنةً مع محلول الشاهد المحلي المتضمن صفار البيض الكامل (20%) في مؤشرات الحركية MOT (60.67%، مقابل 53.69%) والحركة التقدمية (PROG) (42.38% مقابل 39.89%) والسرعة الخطية

©2022 The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry Lands, All rights reserved. **ISSN: 2305-5243; AIF-23 (p: 51 - 63)**

المستقيمة VSL (32.40 ميكرومتر/ثانية مقابل 28.59 ميكرومتر/ثانية). وأظهرت الدراسة ان مؤشرات الحركية لكل من محلولي LDL (8%) والأندروميد كانت متقاربة، حيث بلغت الحركية MOT (60.67% مقابل 59.02% على التوالي) والحركة التقدمية PROG (42.38 %مقابل 45.37% على التوالي). ولم يلحظ أي فرق معنوي بين المحلولين في مؤشري سرعة المسار (VAP)، وخطية المسار (LIN).يُستنتج من هذه الدراسة أن استخدام جزيئات LDL المستخلصة من صفار البيض بتركيز 8% في محلول التمديد حسّن من حركية النطف مقارنة بالمحلول الشاهد المحلي الحاوي 20% صفار البيض الكامل والتراكيز الأخرى المدروسة من LDL.

الكلمات المفتاحية: السائل المنوي، محاليل التمديد، الليبوبروتينات منخفضة الكثافة، كباش العواس السورية.

Abstract

This study aimed to evaluate the efficiency of three concentrations (6%, 8%, 10%) of low density lipoproteins (LDL) instead of egg yolk in Awassi ram semen diluents. Semen was collected during breeding season at rate of three collections per week from four Awassi rams, at age of three years. Two ejaculates were undertaken from each ram by means of artificial vagina. Semen was frozen in liquid nitrogen -196 C_o in five extenders: once foreign control :AndroMed, second local made control containing sodium citrate+ 20% egg yolk and three test extenders, egg yolk was replaced by three concentrations of LDL 6%, 8%, 10% respectively. Motility and live- dead spermatozoa were evaluated by phase contrast microscope and eosin-nigrosin staining technique, motility parameters of thawed frozen semen were estimated under CASA system. There was a significant difference ($P<0.001$) in percentage of live spermatozoa among extenders. Highest percentages of live spermatozoa that was recorded in extender containing 8% LDL, after cooling the live spermatozoa were 73.00%, 70.66%, 67.77%, 68.71%, and 68.60% respectively. The live spermatozoa reduced after freezing and thawing to 62.66%, 60.66%, 54.18%, 51.00%, and 56.40%, respectively. Results of CASA showed a superior of LDL 8% to egg yolk 20% ($p>0.001$) in terms of motility (60.67% versus 53.69%), progressive motility (42.38% versus 39.89%), and VSL (32.40 versus 28.59 µm/s). We remarked that motility parameters were slightly correspondent between LDL 8% and AndroMed extender for motility (60.67 versus 59.02) and progressive motility (42.38 versus 45.37), respectively. Moreover, no significant differences were observed between AndroMed and LDL8% extender for VAP and LIN. our study showed that LDL 8% diluents has improved spermatozoa motility with better efficiency than egg yolk 20% extender.

Keywords: semen, Diluents, Low Density Lipoproteins, Syrian Awassi Ram.

المقدمة

تعتمد فكرة حفظ السائل المنوي على تثبيط حركة النطف وعملياتها الإستقلابية محافظةً عليها من الإنهاك والهلاك خلال فترة الحفظ قصيرة أو طويلة الأمد، وتسهم محاليل تمديد السائل المنوي بشكل كبير في نجاح أو فشل عملية التلقيح الاصطناعي. ومن أهم التحديات التي تواجه عملية تجميد السائل المنوي انخفاض نسبة الخصوبة عند إجراء التلقيح الاصطناعي باستخدام سائل منوي مجمد مقارنةً مع النتائج المحققة عند استخدام السائل المنوي الطازج، فقد لاحظ Maxwell و Salamon (1993) عند حقن السائل المنوي المجمد في قناة عنق الرحم للنعاج، أن نسبة الإخصاب بسائل منوي مجمد ومذاب كانت أقل بنسبة 20 % مقارنة مع نسبة الإخصاب الناتجة عن استخدام السائل المنوي الطازج. حيث يسبب تجميد السائل المنوي تعديلاً في بنية النطف وخصائصها الفيزيولوجية والوظيفية الأمر الذي يخفض من حركتها وقدرتها الإخصابية وفترة بقائها حية، وتوصف هذه التأثيرات بأنها غير عكوسة أي أنها غير قابلة للإصلاح (Salamon

و Maxwell، 2000) فتجميد السائل المنوي يسبب تغيرات في التركيب الكيميائي وترتيب الليبيدات للغشاء البلاسمي للنطف (Amann و Pickett، 1987) الأمر الذي يؤثر سلباً في حركية النطف وقدرتها على الإخصاب.

يمثل محلول سترات الصوديوم مع صفار البيض أحد المحاليل الواقية التي تستخدم في تمديد السائل المنوي لمعظم الأنواع الحيوانية، وكان قد طُور في جامعة كورنيل في الولايات المتحدة الأمريكية (Salisbury وزملاؤه، 1942). ويُعد صفار البيض من أهم المكونات المستخدمة كواقيات من البرودة خلال تجميد النطف (Ritar و Salamon، 1982 ; Tuli وHoltz، 1994)، حيث يعمل على حماية الغشاء الخلوي والمادة الوراثية للنطفة أثناء انخفاض درجة الحرارة (Amirat وزملاؤها، 2005)، بسبب محتواه من الفوسفوليبيدات والكوليسترول والليبوبروتينات منخفضة الكثافة حيث تُسهم هذه المكونات بالإضافة إلى مكونات أخرى مثل Cephalin (Saack، 1993) في حماية النطف من صدمة البرودة (Pace وGraham، 1974؛Watson ،1976؛ Foulkes; 1977) . من جهة أخرى يُعد صفار البيض من المواد ذات التركيب الكيميائي المعقد، وتختلف نسبة الليبيدات فيه وفقا للسلالة ونوع العليقة المقدمة لقطيع الدجاج (Watson،1976)، كما أشار العلماء إلى وجود عوامل في صفار البيض تثبط التبادل الغازي للنطف وتؤثر سلباً في حركيتها (Pace وGraham ،1974 ; Watson وMartin ،1975)، كما أن استخدام صفار البيض ضمن محاليل تمديد السائل المنوي قد ينطوي على مخاطر صحية تتمثل في إمكانية حصول التلوث الجرثومي والفيروسي للسائل المنوي الممدد (Alahmad وزملاؤه، 2008)، إذّ تَمكن Cappucci وزملاؤه (1985) من عزل فيروس أنفلونزا الطيور من صفار بيض الدجاج المصاب بهذا الفيروس، كما ذكر Bousseau وزملاؤه (1998) أن البيض يمكن أن يكون ملوثاً بدرجات متفاوتة بأنواع من البكتيريا كالسالمونيلا والمكورات العنقودية.

ان التطورات الحديثة في تقانة تجميد السائل المنوي تتجه نحو استخدام الجزيئات الرئيسة في صفار البيض المسؤولة عن حماية النطف أثناء مرحلتي التبريد والتجميد، أو تبحث في عزل المركبات الموجودة فيه والمسؤولة تحديداً عن حماية النطف أثناء الحفظ بالتجميد، وهي جزيئات الليبوبروتينات منخفضة الكثافة Low Density Lipoproteins (LDL)، بقصد التخلص من المكونات الموجودة في صفار البيض ذات الأثر الضار في النطف. وقد بيّن Pace وGraham (1974) إن جزيئات (LDL) المعزولة من صفار البيض لها القدرة على حماية النطف من الآثار السلبية الناتجة عن التبريد، وأشار Watson (1976) إلى أن المكون الفعال في صفار البيض المسؤول عن حماية النطف أثناء التبريد والتجميد هو الليبوبروتين منخفض الكثافة (LDL). ويتكون جزئ LDL من 87% ليبيدات و12% بروتينات ذات شكل كروي تسمى Apoprotein وبمتوسط قطر نحو 35 نانومتر (Anton وزملاؤه، 2003) وفيها نواة من الغليسيريدات الثلاثية محاطة بطبقة من الفوسفوليبيدات (Cook و Martin، 1969)، وأشارGraham و Foote (1987) إلى أن LDL تحيط بالغشاء البلاسمي للنطف وتؤمن لها الحماية له من صدمة البرودة (Cold shock)، وأوضح Moussa وزملاؤه (2002) أن خاصية الادمصاص (Adsorption) والالتصاق (Agglutination) تمكنها من تشكيل طبقة حول الغشاء الخلوي للنطف الأمر الذي يسهم في حمايتها من الضرر الناتج عن تشكل البلورات الثلجية أثناء التجميد. وذكر أن عزل LDL من صفار البيض بدرجة نقاوة 97% قد حسّن كثيرا من أداء ممددات السائل المنوي الحاوية عليه.

ومن ناحية أخرى يُعد ممدد الأندروميد أحد النماذج التجارية الناجحة عن محاليل تمديد السائل المنوي الخالية من المركبات ذات الأصل الحيواني حيث تم استخدام ليسيتين فول الصويا عوضاً عن صفار البيض، وقد أثبت هذا الممدد نجاحه كمحلول تمديد للسائل المنوي للعديد من الأنواع الحيوانية كالثيران (Aries وزملاؤه، 2003) والغزال الجبلي (Saragusty وزملاؤه، 2006) والأغنام (Fukui وزملاؤه، 2008) وغيرها من الأنواع الحيوانية.

ويتصف التقييم المخبري للسائل المنوي (*InVitro*) بأهمية تشخيصية كبيرة وذلك لتقييم وظيفة الخصية والبربخ عند الذكور (Rodriguez-Martinez، 2003)،حيث يؤمن نظام تحليل السائل المنوي بوساطة الحاسوب (CASA) معلومات دقيقة وتفصيلية وسريعة حول مؤشرات السائل المنوي (Vertegen وزملاؤه، 2002; Kumar وزملاؤه، 2007)، وقد أسهم هذا النظام المتطور في تقليص الأخطاء الناتجة عن العامل البشري عند تحليل مؤشرات السائل المنوي، كما وجد Januskauskas وزملاؤه (2003) وVertegen وزملاؤه (2002) ارتباطاً معنوياً بين حركية نطف الثيران المقدرة بوساطة جهاز CASA والخصوبة الحقلية، وقد استخدم بنجاح في تقدير مؤشرات حركية السائل المنوي للكباش سواء عند الحفظ قصير الأمد (Joshi وزملاؤه، 2003 ; Kasimanickam وزملاؤه، 2007) أو الحفظ طويل الأمد (Bag وزملاؤه، 2002 ; Joshi وزملاؤه، 2006).

أن هذه المعطيات تظهر ضرورة الكشف عن تأثيرات استخدام جزيئات LDL بديلاً عن صفار البيض في محاليل تمديد السائل المنوي للأغنام المعدة للحفظ القصير والطويل الأمد، ولاسيما إن امتلاك القطر العربي السوري لسلالة عريقة من هذه الحيوانات كأغنام العواس التي تصنف كثروة وطنية ذات أهمية اقتصادية ووراثية يُعد عاملاً مشجعاً في تطوير واستخدام تقانة التلقيح الاصطناعي لما لها من فوائد تتعلق بنشر هذه التراكيب الوراثية المميزة على المستوى المحلي والعالمي كما يمكن أن تصبح مورداً من موارد تأمين القطع الأجنبي للدولة.

الهدف من الدراسة:

يهدف البحث إلى استخدام تراكيز مختلفة (6%، 8%، 10%) من جزيئات LDL المستخلصة من صفار البيض وتحديد التركيز الأمثل منها لاستخدامه في محاليل تمديد السائل المنوي محلية التحضير، بديلاً عن صفار البيض الكامل ومقارنة النتائج مع محلول تمديد قياسي (AndroMed) ومحلول شاهد محلي.

مواد البحث وطرائقه

1- استخلاص جزيئات LDL من صفار البيض:

تم استخلاص جزيئات LDL من صفار البيض حسب طريقة Moussa وزملائه، 2002 كالآتي: كُسرت بيوض دجاج طازجة (خلال 24 ساعة على الأكثر من وضعها)، ثم فُصل الصفار عن البياض (ألبومين البيض) ووضع على ورق ترشيح لإزالة أربطة المح (شرائط ألبومينية) وبقايا الألبومين الملتصقة على الغشاء المحي من خلال تدوير الصفار على ورقة الترشيح، ثم جرح الغشاء المحي بوساطة نصلة مشرط طبي معقم، وسُكب الصفار في دورق على درجة حرارة +4 درجة مئوية لمنع نمو وتكاثر الجراثيم. ومُدِد صفار البيض السابق في محلول فيزيولوجي (0.17 M، NaCl) بنسبة 1:1 (حجم: حجم) وَحُرِك لمدة ساعة عند درجة حرارة +4 درجة مئوية على هزاز مغناطيسي لموازنة المحلول قبل التثفيل بسرعة 10000 × g لمدة 45 دقيقة على درجة حرارة +4 درجة مئوية، حيث انفصل القسم الطافي (البلازما) عن الراسب (الحبيبات). ثم تم تثفيل البلازما مرة ثانية لإزالة كل آثار الحبيبات، وبعد ذلك مزجت البلازما مع 40 % من سلفات الأمونيومِ (Sigma A: 4418) حتى الإشباع (مكافئ إلى 20,5 غ لكل 100 مل من البلازما) لترسيب بروتينات الليفيتين Livetins. وعُدلت درجة الحموضة (pH) وضبطت خلال كل فترة الاستخلاص. بعد ساعة واحدة من التحريك على درجة حرارة +4 درجة مئوية، تم تثفيل المزيج على سرعة 10000 × g لمدة 45 دقيقة، واستبعد الراسب وتمت ديلزة (Dialyse) القسم الطافي بالماء المقطر لإزالة سلفات الأمونيوم باستعمال غشاء الدياليز(MCL 8 x 100 CLR) (Sigma - D: 9527)، يتكون أثناء عملية الديلزة راسب غني بالبروتينات الدهنية منخفضة الكثافة نتيجة خروج سلفات الامونيوم عبر بودان الدياليز، بعدها ثُقل المحلول ثانية بسرعة 10000 × g لمدة 45 دقيقة بدرجة حرارة +4 درجة مئوية، ثم جُمع الراسب المتشكل الغني بالبروتينات الدهنية منخفضة الكثافة LDL.

2- جمع السائل المنوي:

نُفذت هذه المرحلة في مختبر التلقيح الاصطناعي ونقل الأجنة في محطة بحوث ازرع- في محافظة درعا (سورية) والتابعة للمركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (ACSAD)،خلال عام2012، حيث جُمع السائل المنوي بوساطة المهبل الاصطناعي من أربع طلائق تلقيح اصطناعي من أغنام العواس بعمر3 سنوات وبمتوسط وزن 75±3 كغ بواقع قذفتين/يوم /كبش ، وكُررت العملية ثلاث مرات في الأسبوع طوال الموسم التناسلي وباعتبار أن الذكور المستخدمة مدروسة سابقاً ولا يوجد فرق معنوي في مواصفات سائلها المنوي فقد تم دمج قذفات الذكور الأربعة معا في كل يوم جمع ثم قسمت إلى خمسة أقسام لتمديدها بخمسة أنواع من محاليل التمديد.

3- محاليل التمديد المستخدمة في تجميد السائل المنوي:

تم تمديد السائل المنوي لكباش العواس بخمسة أنواع من محاليل التمديد أَربعةٌ منها محلية التحضير وواحد مستورد، استخدم محلول سترات الصوديوم مع الغلوكوز وصفار البيض حيث أضيفت 3.52 غرام من سترات الصوديوم و194 ملغ غلوكوز الى نحو 60 إلى 70 سم^3 ماء مضاعف التقطير وحُركت حتى تمام الذوبان، ثم أضيف 20 سم^3 من صفار البيض (20% حجم/ حجم) و6.4 % من الغليسرول مع التحريك، وقد اعتمد كمحلول شاهد محلي. وبالنسبة للمحاليل التجريبية تم الاستعاضة عن صفار البيض بثلاثة تراكيز (6%و 8%و 10%) من الليبوبرتينات منخفضة الكثافة (LDL) حيث

أضيفت الى محلول سترات الصوديوم والغلوكوز. كما استخدم محلول تجاري جاهز (AndroMed) كمحلول شاهد قياسي حيث تمت إضافة جزء من المحلول الجاهز الى أربعة أجزاء من الماء مضاعف التقطير (معدل التمديد 1:4)، وعُدلت درجة الحموضة (pH) لجميع المحاليل إلى 6.8 عند الضرورة باستخدام حمض كلور الماء 10%.

الجدول 1. محاليل التمديد المستخدمة في تمديد السائل المنوي (في 100 سم^3 ماء مضاعف التقطير).

المحاليل	محلول الشاهد المحلي	محلول الشاهد القياسي	المحاليل المختبرة الحاوية على تراكيز مختلفة من جزيئات (LDL)		
المكونات الأساسية	3.52غ سترات الصوديوم	ANDROMED	3.52غ سترات الصوديوم	3.52غ سترات الصوديوم	3.52 غ سترات الصوديوم
	194 ملغ غلوكوز		194 ملغ غلوكوز	194 ملغ غلوكوز	194 ملغ غلوكوز
	%20 صفار البيض		%6 LDL	%8 LDL	%10 LDL
	% 6.4 غليسرول		%6.4 غليسرول	% 6.4 غليسرول	% 6.4 غليسرول

4- تجميد السائل المنوي:

نُقلت العينات الممددة الى براد على درجة حرارة +4 م° وبقيت لمدة 2.5 ساعة (فترة التوازن والتبريد)، وأثناء فترة التوازن والتبريد حُضر العدد المطلوب من القشات لكل محلول تمديد، ووضعت في البراد لفترة كافية لخفض حرارتها إلى 4 م°، وتم تزويد آلة تعبئة القشات وإغلاقها بالمعلومات الخاصة حول العينة، بعد انقضاء مدة 2.5 ساعة في البراد عُبئ السائل المنوي الممدد في قشات سعتها 0.5 سم^3 مصنوعة من الكلوريد بوليفينيل إنتاج شركة (I. M. V, L Aigel, France) لتغلق آلياً وهي في البراد، ثم وُضعت القشات المعبأة على حامل معدني خاص يتسع لـ 40 قشة، وتركت في البراد حتى نهاية عملية التعبئة والإغلاق لبقية القشات. شُغِل نظام التجميد الآلي (حاسب، منظم آلي، خزان سائل أزوتي مضغوط، حجرة تجميد)، وأتبعت التعليمات التي تظهر على شاشة الحاسب المتضمنة عدة خطوات تؤدي إلى خفض حرارة قشات السائل المنوي الممدد من 4 م° إلى – 140 م° خلال 4 دقائق في بخار السائل الآزوتي بما يدعى التجميد الأولي. بعد الوصول إلى التجميد الأولي تُنقل القشات المجمدة أولياً إلى وعاء عازل من الستريوبور مملوء بالسائل الآزوتي لتتم فيه عملية التجميد النهائي على حرارة – 196°م. ثم نقلت القشات المجمدة إلى الحامل المخصص من خزانات السائل الآزوتي للتخزين.

5- تقييم السائل المنوي:

- **التقييم المجهري:** قيم السائل المنوي من حيث نسبة الحركية والنطف الميتة والحية في كل مرحلة من مراحل معاملته (طازج، مبرد، مجمد) باستخدام مجهر تباين الأطوار Phase contrast microscope. وصبغة ايوزين – نيكروزين وكذلك استخدم جهاز CASA لتقييم السائل المنوي المجمد بعد الإذابة.
- **التحليل الآلي لمؤشرات السائل المنوي المجمد باستخدام جهاز CASA:**

قُيمت مؤشرات حركية النطف من كل ممدّد بمساعدة نظام تحليل السائل المنوي الـ (Computer-assisted Sperm Vision® 3.5 semen analysis - CASA) (Minitüb, Tiefenbach, Germany) الموجود في مختبر التلقيح الاصطناعي ونقل الأجنة في كلية الطب البيطري في جامعة البعث (حماة/سورية). من خلال التقاط 30 صورة من الحقل المجهري في الثانية وتحليلها، ويؤمن هذا الجهاز معلومات دقيقة جداً حول خصائص ومؤشرات حركة النطاف (Sundararaman وEdwin، 2008)، حيث أُخذ 2.5 ميكرولتر من العينة (القشة)، ووضعت في الحفرة الخاصة بها على الشريحة المدفئة على درجة حرارة 37 م°، وقام الجهاز بقياس عدد من المؤشرات المتعلقة بحركية وحيوية وسرعة النطف وهي:

- الحركية % Motility
- الحركة التقدمية (الأمامية) Progressive Motility (PROG %)

- معدل مسافة المسار DAP (Distance Average Path, µm)
- مسافة الخط المنحني DCL (Distance Curved Line, µm)
- مسافة الخط المستقيم DSL (Distance Straight Line, µm)
- معدل سرعة المسار VAP (Velocity Average Path, µm /sec)
- السرعـــة الخَطِّيـــة المنحنية VCL (Curvilinear Line Velocity, µm/s)
- السرعـــة الخَطِّيـــة المستقيمـــة أو التقدميـــة VSL (Straight Line Velocity,µm/s)،
- خطية المسار (LIN) الذي يعبر عن (VSL/VCL *100)
- المـــدى الجانبـــي لضربـــات الـــرأس ALH (Amplitude Lateral Head Displacement,µm).

6- التحليل الإحصائي (Statistical Analysis):

تم تحليل البيانات وفق التصميم العشوائي الكامل، باستخدام النموذج الخطي العامGeneral Linear Model (GLM)، ويستخدم لذلك الغرض برنامج (SAS، 2008) لإجراء عمليات التحليل الإحصائي كافةً، وتم حساب متوسط المربعات الصغرى (LSM)، وفصل المتوسطات بين المعاملات باستخدام طريقة Duncan (1995)، واستخدم النموذج الخطي التالي Model 1 لتقدير تأثير المعاملات في المؤشرات المدروسة:

$$\textbf{Model 1} \qquad Y_{ijk}= \mu + E_i+H_j+ e_{ijk}$$

حيث:

Y_{ijk}: المؤشر العام المدروس (الحركية، الحركة التقدمية،....)

μ : المتوسط العام للمؤشر المدروس

E_i : تأثير الممدد المختبر حيث i تمثل 1, 2,3,4,5.

H_j : تأثير مرحلة المداولة حيث j تمثل 1،2 (بعد التبريد، بعد الإذابة).

E_{ijk}: وحدة الخطأ العشوائي المرتبطة مع Y_{ijk} والتي من المفترض أن تكون مستقلة وموزعة طبيعيا بمتوسط صفر وتباين $I\sigma^2e$.

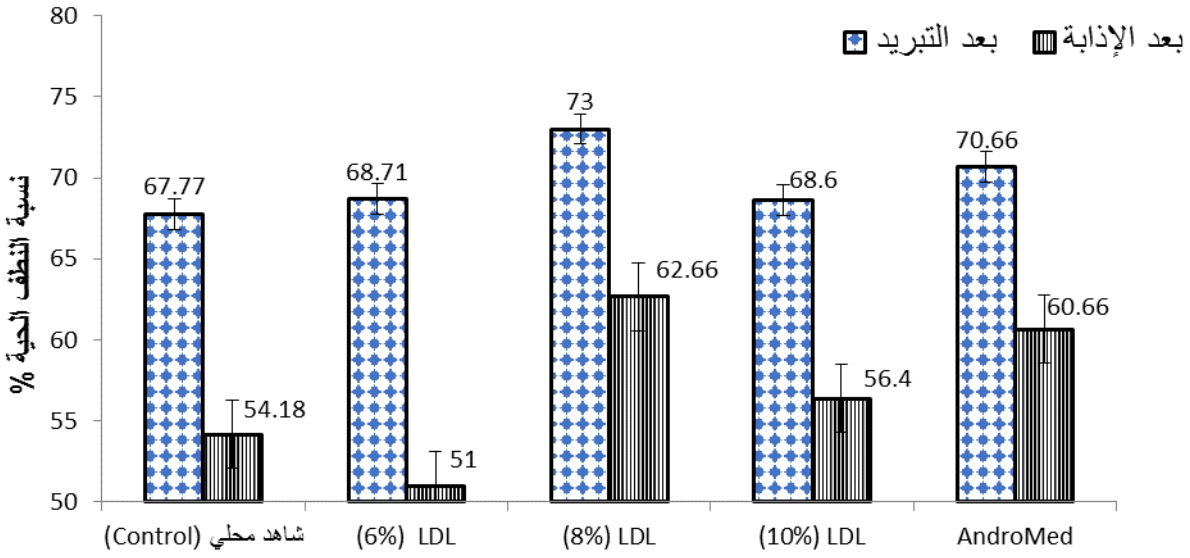
النتائج والمناقشة

1- تقييم المؤشرات المخبرية باستخدام صبغة التلوين القياسية (ايوزين- نيكروسين):

يُلاحظ من خلال مقارنة نسب النطف الحية خلال مراحل مداولة السائل المنوي (بعد التبريد و بعد الإذابة) باستخدام صبغة ايوزين- نيكروزين تفوق عالي المعنوية ($P<0.001$) للمحلول الحاوي LDL بتركيز8 % مقارنة بالمحلول القياسي (الشاهد المستورد) والشاهد المحلي، وبالتركيزين الآخرين من LDL (6% و 10%)، (الجدول 2)، ففي نهاية مرحلة التبريد والتوازن بلغت نسبة النطف الحية 73% في محلول LDL 8% في حين بلغت 70.70% و 67.80 % و 68.70% و 68.60% في محاليل الشاهد القياسي (الأندروميد) و محلول الشاهد المحلي، LDL 6% وLDL 10% على التوالي، وتراجعت هذه النسبة بعد التجميد والإذابة لتبلغ 62.70 % في محلول LDL 8% و 60.70% و 54.20% و 51.00% و 56.40% في المحاليل السابقة على التوالي (الشكل 1).

الجدول 2. تحليل التباين لتأثير الممدد في نسبة النطف الحية خلال مراحل المداولة.

مصدر التباين		درجات الحرية (DF)	بعد التبريد	بعد التجميد والإذابة
نوع الممدد		4	49.76^{***}	203.59^{***}
الخطأ التجريبي	بعد التبريد	31	1.722	1.21
	بعد التجميد	33		



الشكل 1. النسبة المئوية للنطف الحية (%) خلال مراحل مداولة السائل المنوي (بعد التبريد وبعد التجميد).

2- التقييم الإلكتروني للمؤشرات المخبرية للسائل المنوي الممدد باستخدام جهاز CASA:

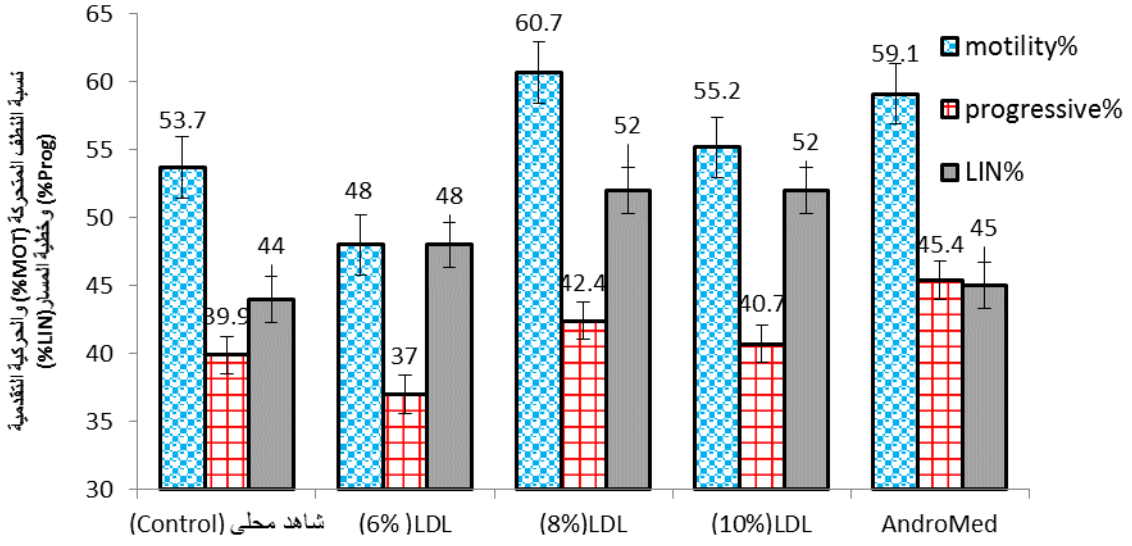
يبين الجدول 3 نتائج تحليل التباين للممددات المستخدمة وتأثيرها في مؤشرات الحركة المدروسة بوساطة جهاز الكازا (CASA) بعد ازالة التجميد، وهو يؤمن معلومات دقيقة جداً حول خصائص ومؤشرات الحركة للنطف (Sundararaman و Edwin، 2008).

الجدول 3 جدول تحليل التباين لمؤشرات السائل المنوي المجمد بعد الإذابة بوساطة جهازCASA

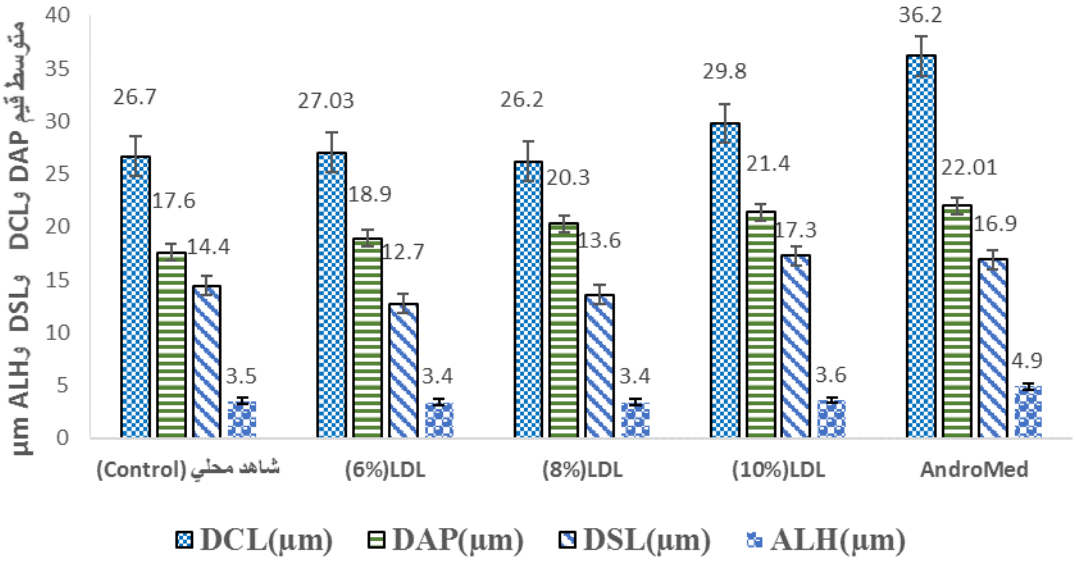
المؤشرات المدروسة	DF	نوع الممدد	الخطأ التجريبي	DF (للخطأ التجريبي)
الحيوية العامة (النسبة المئوية للنطف المتحركة) (MOT%)	4	$(226.49)^{***}$	16.186	48
النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية (PROG%)		$(110.11)^{***}$	8.259	
خطية المسار (LIN%)		$(40)^{*}$	11	
معدل مسافة المسار (DAP µm)		$(40.326)^{*}$	15.51	
مسافة الخط المنحني(DCL µm)		$(238.16)^{**}$	52.03	
مسافة الخط المستقيم(DSL µm)		$(43.24)^{ns}$	16.15	
المدى الجانبي لضربات الرأس(ALH µm)		$(4.75)^{**}$	60.8	
معدل سرعة المسار(VAP µm/sec)		$(337.43)^{**}$	89.41	
السرعة الخطية المنحنية (VCL µm/sec)		$(944.39)^{*}$	265.05	
السرعة الخطية المستقيمة(VSL µm/sec)		$(362.62)^{**}$	71.67	

إن استخدام LDL في محاليل التمديد بتراكيز مختلفة (6% و 8% و 10 %) عوضاً عن صفار البيض الكامل حسّن من قيم مؤشرات الحركية وأدى الى تفوق في أغلب المؤشرات المدروسة مقارنةً مع محلول الشاهد المحلي (سترات الصوديوم وصفار البيض 20%) ، وهو ما يتطابق مع نتائج دراسات عديدة أوضحت أهمية استخدام LDL كواقٍ من البرودة بديلاً عن صفار البيض الكامل في محاليل تمديد السائل المنوي لأنواع حيوانية متعددة كالثيران (Moussa وزملاؤه، 2002)، والخنازير(Jiang وزملاؤه، 2007)، والماعز (ALAhmad وزملاؤه، 2008)، والكلاب (Bencharif وزملاؤه، 2008)، وسمك السلمون المرقط (Perez-cerezalez وزملاؤه، 2010)، والجواميس (Akhter وزملاؤه،2011)، والخيول (Pillet وزملاؤه،2011).

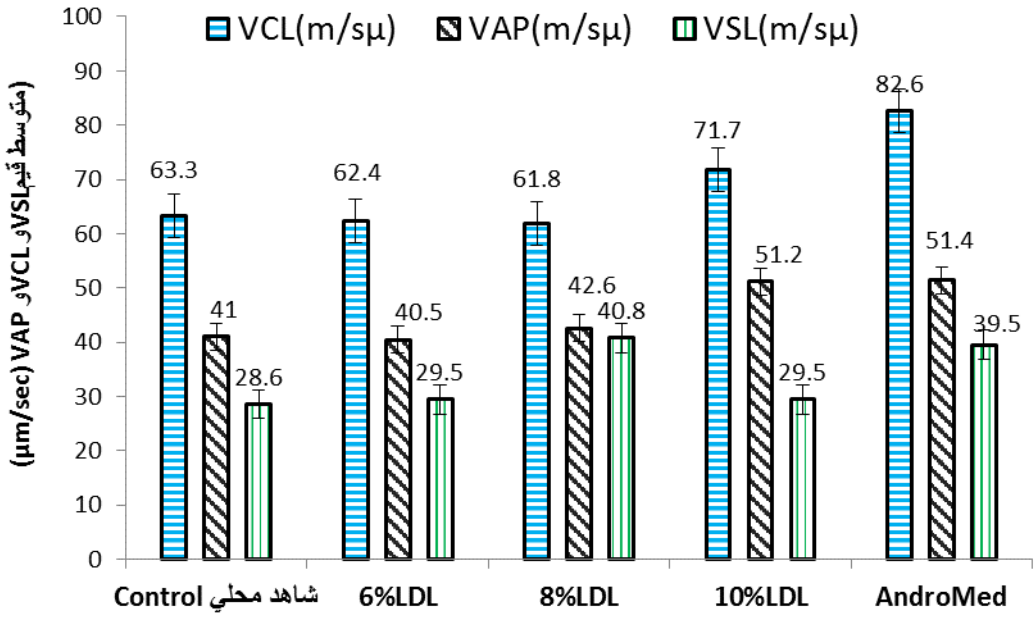
أظهر محلول LDL 8% تفوقاً عالي المعنوية (P<0.001) في مؤشرات الحركية (MOT) (60.67%) والحركة التقدمية (PROG) (42.40%) وتفوقاً معنوياً (P<0.01) في مؤشر السرعة الخطية المستقيمة (VSL) (40.80 ميكرومتر/ثانية) مقارنةً مع محلول صفار البيض الكامل (20%). وتفيد بعض الأبحاث بأن هذه المؤشرات ترتبط مع القدرة الإخصابية للنطف (Vertegen وزملاؤه، 2002)، وتُعدّ مفيدةً بخصوص التنبؤ عن جودة السائل المنوي وقدرته الإخصابية (Kirk وزملاؤه، 2005). وقد ذكرت Amirat وزملاؤها (2005) أن نسبة النطف التي تعرضت للضرر على مستوى الغشاء البلاسمي والجسيم الأكروزمي عند حفظها على درجة حرارة 4 مْ لمدة أربع ساعات في محلول تمديد يحوي صفار بيض بلغت 80 % مقارنةً مع 3% فقط عند حضانتها في محلول تمديد يحوي LDL. وبالمقارنة مع المحلول القياسي (الشاهد الأجنبي) لوحظ ان نتائج مؤشرات الحركية كانت متقاربة مع محلول LDL (8%)، حيث بلغت الحركية العامة (MOT) 60.70% في محلول LDL (8%) مقابل 59.10% في محلول الأندروميد، وكذلك لم يلحظ أي فرق معنوي بين المحلولين فيما يخص خطية المسار (LIN) (52 مقابل 45%)، ومعدل سرعة المسار (VAP) (42.6 مقابل 51.4 ميكرومتر/ثانية)، والسرعة الخطية المستقيمة (VSL) (40.8 مقابل 39.5 ميكرومتر/ثانية) على التوالي. وقد تفوق محلول الاندروميد على المحاليل المستخدمة في التجربة كافة فيما يخص مؤشرات الحركة التقدمية الأمامية (PROG)، ومسافة الخط المنحني (DCL)، والسرعة الخطية المنحنية (VCL)، والمدى الجانبي لضربات الرأس (ALH)، وكانت قيم هذه المؤشرات لمحلول الأندروميد (45.40 و 36.20 و 82.60 و 4.89) على التوالي. (الأشكال 2 و3 و4).



شكل رقم 2. قيم الحركية (MOT) والحركية التقدمية (PROG) وخطية المسار(LIN) للنطف بعد التجميد والإذابة في محاليل التمديد المختلفة.



شكل 3. قيم معدل مسافة المسار (DAP)، ومسافة الخط المنحني (DCL)، ومسافة الخط المستقيم (DSL)، والمدى الجانبي لضربات الرأس (ALH) للنطف بعد التجميد والإذابة في محاليل التمديد المختلفة.



شكل 4. قيم معدل سرعة المسار (VAP)، ومنحنى السرعة المنحنية (VCL)، والسرعة المستقيمة (VSL)، للنطف بعد التجميد والإذابة في محاليل التمديد المختلفة.

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع أبحاث عديدة حول ضرورة استخدام الجزيئات المسؤولة عن حماية النطف من تأثير صدمة البرد في محاليل تمديد السائل المنوي، عن طريق عزل المواد المسؤولة عن الأثر الواقي من البرودة والموجودة في صفار البيض وهي الليبوبروتينات منخفضة الكثافة (LDL). وقد عُزي الأثر الواقي لجزيئات LDL في حماية النطف من الآثار السلبية لعمليتي التجميد والإذابة نتيجة لتعرض بنية LDL للتمزق والتخريب، مما يسبب تحرر الفوسفوليبيدات والغليسريدات الثلاثية في حين يشكل الأبوبروتين (Apoprotein) مادة هلامية (Moussa وزملاؤه، 2002). وتشكل الفوسفوليبيدات المتحررة طبقة تقي النطف من التأثيرات الضارة لعمليتي التجميد والإذابة (Quinn وزملاؤه، 1980) كما أوضح Graham و Foote (1987) وTrimeche وزملاؤه (1996) أن الفوسفوليبيدات المتحررة من LDL تعوض

الفاقد من فوسفوليبيدات الغشاء البلاسمي نتيجة التجميد مما يعزز من قدرة النطف على تحمل صدمة البرد، ويقوم LDL بشكل مباشر أو غير مباشر بتقليص التعديلات التي تطرأ على بنية الغشاء البلاسمي للنطف نتيجة لعمليتي التجميد والإذابة (Moussa وزملاؤه، 2002 ; Bergeron وزملاؤه، 2004).

يحوي محلول الشاهد المحلي المستخدم في التجربة على صفار بيض كامل بنسبة 20 % (حجم/ حجم)، والمعلوم أن صفار البيض الكامل يتكون من 50% مادة جافة، يشكل LDL منها قرابة 66% وبالتالي تكون نسبة LDL في محلول الشاهد حوالي 6.6 % تقريبا وهي نسبة قريبة جداً من نسبة LDL في المحاليل التجريبية المختبرة والتي تفوقت في أغلب مؤشرات الحركة المختبرة على محلول الشاهد مما يدفع للتساؤل حول أسباب تفوق المحاليل التجريبية على الرغم من تقارب نسبة LDL فيها مع المحلول الشاهد المحلي.

إن LDL مركب أقل تعقيداً من الناحية الكيميائية مقارنة بصفار البيض الكامل (Vera-Munoz وزملاؤه، 2009)، واستخدامه يسمح بتحييد مكونات صفار البيض ذات الأثر الضار في النطف أثناء الحفظ بالتجميد كالبروجسترون والليبوبروتينات عالية الكثافة، (HDL) (Hu وزملاؤه،2011)، وقد أشار Pace و Graham (1974) إلى أن حبيبات صفار البيض (الغرانيولوزا) تمارس تأثيراً ضارا في حركية النطف المجمدة (للثيران) بعد الإذابة وهو ما أيده (Demianowicz و Strezek، 1996) في دراسات حول السائل المنوي للخنازير، كما توصل Watson و Martin (1975) إلى استنتاجات مشابهة حول التأثيرات السلبية لغرانيولوزا صفار البيض الكامل في السائل المنوي للكباش. من جهة أخرى فسر Manjunath وTh**é**rien (2002) آلية عمل LDL من خلال قدرته على التفاعل بشكل سريع ونوعي مع بروتينات البلازما المنوية (BSP-proteins) فيتشكل معقد LDL-BSP proteins ويكون هذا المعقد ثابتاً حتى بعد إذابة التجميد. حيث تسبب هذه البروتينات اضطراباً في الغشاء البلاسمي للنطف من خلال استنزاف محتوى الكوليسترول والفوسفوليبيدات منها مما يجعلها حساسة لعملية التجميد.

الاستنتاجات والمقترحات

1- إمكانية استخدام الليبوبروتينات منخفضة الكثافة (LDL) بنجاح في محاليل تجميد السائل المنوي لذكور العواس، مما يثبت الأثر الواقي لها في حماية النطف من الآثار السلبية لعمليتي التجميد والإذابة.
2- إمكانية استخدام محلول LDL بتركيز 8 % (وزن / حجم) بديلاً عن صفار البيض الكامل (20%) ضمن محلول تمديد السائل المنوي لكباش العواس.
3- يُقترح تجميد السائل المنوي بمحلول (سترات الصوديوم وLDL 8%) واستخدامه في التلقيح الاصطناعي لمعرفة نتائج الخصوبة الحقلية جراء استخدام LDL.
4- يُقترح دراسة تأثير استخدام LDL ضمن محاليل تمديد السائل المنوي للأنواع الحيوانية المنتشرة في القطر العربي السوري.

المراجع

- **Akhter, S.M., S. Ansari, B.A.Rakha, S.M.H.Andrabi, M. Khalid and N. Ullah .** 2011**.** Effect of low-density Lipoproteins in extender on freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. Theriogenology; 76: 759-764.
- **Al Ahmad, M. Z., G. Chatagnon, L. Amirat-Briand, M. Moussa, D. Tainturier, and M. Anton**. 2008. Use of Glutamine and Low-Density Lipoproteins Isolated from Egg Yolk to Improve Buck Semen Freezing. ReprodDomestAnim; 43(4): 36– 429
- **Amann, R, and B. Pickett.** 1987**.** Principles of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. Equine Vet Sci ;7 :145–73.
- **Amirat,L ,M.Anton, D. Tainturier, G.Chatagnon, and I.C.J.L. Battut.** 2005**.** Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density

lipoprotein and Triladyl before, during and after freezing and thawing. Reprod.,129:535-543.

- **Anton, M., V. Martinet, M. Dalgalarrondo, V. Beaumal, E.David-Briand, and H.Rabesona.** 2003**.** Chemical and structural characterization of low-densitylipoproteins purified from hen egg yolk. Food Chem. 83:175–183.
- **Aires, V.A., K.D. Hinsch, F. Mueller-Schloesser, K. Bogner, S. Mueller-Schoedder, and E. Hinsch.** 2003**.** *In vitro* and *In vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. Theriogenology 2003; 60: 269–279.
- **Bag, S., A. Joshi, S.M.K. Naqui, P.S. Rawat, and J.P. Mittal.** 2002**.** Effect of freezing temperature at which straws were plunged into liquid nitrogen on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci*, vol. 72: 175-183.
- **Bencharif,D , L. Amirat, M. Anton, E. Schmitt, S. Desherces, and G. Delhomme.** 2008**.** The advantages of LDL (lowdensity lipoproteins) in thecryopreservation of canine semen. Theriogenology 70, 1478–1488.
- **Bergeron,A., M.H. Crête, Y. Brindle, and P.Manjunath.**2004. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. BiolReprod. ;70:708-717.
- **Bousseau,S., J. Brillard, B. Marguant-LeGuienne, B. Guerin, A. Camus, and M. Lechat.** 1998**.** Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the *In vitro* and *In vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin-based diluents. Theriogenology 50, 699–706.
- **Cappucci, D, D. Johnson, M. Brugh, T. Smith, C. Jackson, J. Pearson, and D. Senne. 1985.** Isolation of avian influenza virus (subtype H5N2) from chicken eggs during a natural outbreak. Avian Dis 9:1195–1200.
- **Cook,W.H., and W.G. Martin . 1969.** Egg lipoproteins. In: Tria, E., Scanu, A.M.(Eds.), Structural and Functional Aspects of Lipoproteins in Living Systems. Academic Press, New York :579–615.
- **Demianowicz,W., and J. Strezek .** 1996**.** The effect of lipoprotein fraction of egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. Reprod. Dom. Anim., 31:279-280.
- **Duncan. D. R.** 1995. Multiple range and multiple F test. *J. Bomemetries;* **11**: 1- 42.
- **Foulkes, J.A.** 1977**.** The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and the integrity of bovine spermatozoa. J.Reprod. Fertil. 49:277–284.
- **Fukui,Y., H. Kohno, T. Togari, M. Hiwasa, and K. Okabe.** 2008**.** Fertility after artificial insemination using a soyebeen-based semen extender in sheep J.Reprod. Dev., vol. 54,(4): 286-28.
- **Graham, J.K., and R.H. Foote.** 1987**.** Effect of several lipids' fatty acyl chain length and degree of un saturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. Cryobiology 24: 42–52.

- **Hu, JH., Z.L. Jiang, R.K.L. V, Q.W. Li, S.S. Zhang, L.S. Zan,Y.K.Li, and X. Li .** 2011**.** The advantages of low- density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. Cryobiology;62: 83-87.
- **Januskauskas A., A. Johannisson, and H. Rodriguez-Martinez. 2003.** Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*.; 60:743-758.
- **Jiang ZL., Q.W. Li, J.H. Hu, W.Y. Li, H.W. Zhao, and S.S. Zhang.** 2007**.** Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low-density lipoprotein in diluents.Cryobiology; 54: 301-304.
- **Joshi A, S.M.K. Naqvi, S. Bag, A.K. Dang, R.C. Sharma, P.C. Rawat, and J.P. Mittal**. 2003. Sperm motion characteristics of Garole rams raised for a prolonged period in a semi-arid tropical environment. *Trop Anim Hlth Prod*, 35:249-257.
- **Joshi A., A.K. Mathur, S.M.K. Naqvi, and J.P. Mittal**. 2006. Influence of osmolality of complete semen extender on motion characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa. *Asian-Aust J Anim Sci*, 19:1716-1721.
- **Kasimanickam, R., V. Kasimanickam, K.D. Pelzer, and J.J. Dascanio**. 2007. Effect of breed and sperm concentration on the changes in structural, functional and motility parameters of ram-lamb spermatozoa during storage at 4°C. *Anim Reprod Sci*, 101:60-73.
- **Kirk, E.S., E.L.Squires, and J.K. Graham .** 2005**.**Comparsion of in vitro laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. Theriogenology,64:1422-1439.
- **Kumar D., A Joshi, S.M.K. Naqvi, S. Kumar, A.K. Mishra, V.P. Maurya ,A.L. Arora, J.P.Mittal, and V.K. Singh .** 2007**.** Sperm motion characteristics of Garole X Malpura sheep evolved in a semiarid tropical environment through introgression of FecB gene. *Anim Reprod Sci*, 100:51-60.
- **Manjunath,P., and I.Thérien. 2002.** Role of seminal plasma phospholipids-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. ReprodImmunol,53:109-119.
- **Maxwell, W.M., and S. Salamon.** 1993**.** Liquid storage of ram semen: areview. Reprod. Fertil. Dev,5:613-638
- **Moussa, M., V.Martinet, A.Trimeche, D.Tainturier, and M.Anton.** 2002. Low-density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen–thawed bull semen. Theriogenology57: 1695–1706.
- **Pace, M.M., and E.F. Graham.**1974**.** The components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. J. Anim. Sci. 39: 1144–1149
- **Perez-Cerezales, S., S. Martinez-Paramo, J. Beirao, and M.P. Herraez .**2010**.** Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant. Theriogenology ;74: 282-289.
- **Pillet E., G. Duchamp, F. Batellier, V. Beaumal, M. Anton, S. Desherces, E.Schmitt, and M. Magistrini . 2011.** Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. Theriogenology ;75: 105-114.

- **Quinn,P.J., P.Y.W. Chow, and I.G. White.** 1980**.** Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J. Reprod.Fertil.***60:** 403–407.
- **Ritar, A.J., and S. Salamon .** 1982**.** Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawedspermatozoa of the Angora goat. Aust J BiolSci, 35: 305-312.
- **Rodriguez-Martinez, H.** 2003**.** Laboratory semen assesment and prediction of fertility: stil utopia? *Reprod. Dom. Anim,* vol. 75: 312-318.
- **Saacke, A.G.** 1993**.** Factors Affecting Spermatozoa Viability from Collection to Use. Dep. of Dairy Sci. Virginian Polytechnic Institute and State University. Blacksburk.
- **Salamon S., and W.M.C. Maxwell**. 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*, 62:77-111.
- **Salisbury, G. W., H. K. Fuller, and E. L. Willett.** 1942**.** Preservationof bovine spermatozoa in yolk-citrate diluent and field results from its use. J. Dairy Sci. 24:905–910.
- **Saragusty, J, H. Gacitua, R. King, and A. Arav** .2006. Post-mortem semen cryopreservation and characterization in two different endangered Gazelle species (*Gazelle gazella* and *Gazelle dorcas*) and one subspecies (*Gazelle gazelle acaiae*). *Theriogenology*: 66: 775–784.
- **SAS.** 2008**.** User's guide statistics (Ver 9.2) SAS institute inc., cary, NC, USA.
- **Sundaraman,M.N., and M.N.Edwin.** 2008**.** Changes in motility Characteristics of Goat Spermatozoa During Glycerol-Equilibration and the Relevance to cryopreservation. Asian Journal of Cell Biology 3(1):22-33.
- **Trimeche A., P. Renard, and D. Tainturier.** 1996**.** La Glutamine : un Nouveau Cryoprotecteur Pour Congeler le Sperme. Modèle d'étude : Le baudet du Poitou. *Bull Acad Ve´t de France ; 69 :54– 447.*
- **Tuli R.K., and W. Holtz.** 1994**.** Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and goat-release from Boer goat spermatozoa.Theriogenology, **42:** 547-555.
- **Vera- Munoz. O., L. Amirat- Briand, T. Diaz, L. Vasquez, E. Schmidt, S. Desherces, M. Anton, D. Bencharif, and D. Ainturier.** 2009**.** Effect of Semen Dilution to Low-Sperm Number Per Dose on Motility and Functionality of Cryopreserved Bovine Spermatozoa Using Low- Density Lipoproteins (LDL) Extender: Comparison to Triladys1 and Bioxcell. *Theriogenolog; 71:* 895-900
- **Vertegen,J., M.Iguer-Ouada, and K.Onclin.** 2002**.**Computer Assisted Semen Analyzers in Andrology Research and Veterinary Practice. Theriogenology 57:149-179.
- **Watson, P. F., and I. C. A. Martin.** 1975**.** Effects of Egg Yolk, Glycerol and the Freezing Rate on the Viability and Acrosomal Structures of Frozen Ram Spermatozoa. *J. Bio. Sci;* 28: 153-159.
- **Watson, P.F.** 1976**.** The protection of ram and bull spermatozoa by the low-density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5°C and deep-freezing.Thermal Biology 1: 137-141.

N° Ref: 534