مشاركة الحمض الأميني البرولين مع جزيئات LDL في ممددات السائل المنوي عند كباش العواس

Combined Amino Acid Proline with LDL Fractions in Awassi Rams Semen Extenders

م. محمد باشاوات[1]   أ. د. محمد ربيع المرستاني[1-4]   د. محمد موسى[2-4]   أ. د. دانيال تنتوربيه[3]

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

embryotransfer_2000@yahoo.com

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

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

(2) قسم الجراحة والولادة، كلية الطب البيطري، حماة، سورية.

(2) Dep. of Surgery and Obstetrics, Faculty of Veterinary Medecine, University of Hama, Syria.

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

(3)Ecole Nationale Veterinarie de Nante, France.

(4) المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة/أكساد.

(4)The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry Lands/ACSAD.

الملخص

نفذ البحث في محطة بحوث ازرع (درعا/سورية)، التابعة للمركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (أكساد)، بهدف تقييم فعالية مشاركة الحمض الأميني البرولين مع الليبوبروتينات منخفضة الكثافة (LDL) المستخلصة من صفار البيض المضافة إلى محلول تمديد محلي لكباش العواس.

جمع السائل المنوي بوساطة المهبل الاصطناعي طوال الموسم التناسلي لعام 2013، وبمعدل ثلاث مرات أسبوعياً، من أربعة ذكور من كباش العواس بعمر 3 سنوات، ومتوسط وزن 75 ± 3 كغ. مُدّد السائل المنوي في خمسة أنواع من محاليل التمديد هي: الأندروميد (شاهد قياسي)، ومحلول سترات الصوديوم والغلوكوز المضاف إليه LDL بتركيز 8 %، والبرولين بتركيزين (25 و 50) ميللي مول/مل، ومحلول سترات الصوديوم والغلوكوز المضاف له صفار البيض الكامل بتركيز 20 %، والبرولين بتركيزين (25 و 50) ميللي مول/مل. ثم جُمد في سائل الآزوت (196- م°). قُيمت حيوية النطاف باستخدام مجهر تباين الأطوار، واستخدمت صبغة أيوزين ـ نيكروسين لتمييز النطاف الحية والميتة عند كل مرحلة من مراحل مداولة السائل المنوي، كما استخدم جهاز تحليل السائل المنوي بمساعدة الحاسوب (CASA) في تقييم المؤشرات الحركية بعد الإذابة. بلغت نسبة النطاف الحية المقدرة بوساطة صبغة أيوزين ـ نيكروسين بعد إزالة التجميد 66.40 % في محلول LDL+25P، وتفوق هذا المحلول معنوياً ($P<0.001$) على بقية المحاليل المختبرة، إذ بلغت نسبة النطاف الحية بعد إزالة التجميد 62.10 و60.70 و58.50 و56.71 % في محاليل LDL+50P وأندروميد و EY+25P و EY+50P على التوالي.

©2018 The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry Lands, All rights reserved. ISSN:2305 - 5243 ; AIF(NSP)-177

كما أظهرت نتائج تحليل مؤشرات حركية النطاف باستخدام جهاز CASA تفوقاً معنوياً (P<0.001) لمحلول التمديد المضاف له LDL 8 % و25 ميللي مول/مل برولين في مؤشر الحركية (MOT) بعد الإذابة والحركة التقدمية (PROG)، وبلغت 64.97 و 60.30 و 59.02 و 56.40 و53.51 % للحركية، مقابل 47.18 و44.86 و45.37 و42.14 و39.85 % للحركة التقدمية، في محاليل LDL+25 P وLDL+50 P وأندروميد وEY+25P و EY+50P على التوالي. وتبين وجود تأثير معنوي (P<0.001) للمحاليل المدروسة في مؤشر منحنى السرعـة الخَطِّيـة VCL، وبلغت القيم 90.80، 81.49 و 82.57 و 85.19 و 83.88 ميكروميتر/ثانية على التوالي.
يُستنتج من هذه الدراسة أن مشاركة الحمض الأميني برولين مع الليبوبروتينات منخفضة الكثافة (LDL) أظهرت تأثيراً تآزرياً واقياً من البرودة عند استخدامهما معاً في محاليل تمديد السائل المنوي لكباش العواس.
الكلمات المفتاحية: السائل المنوي، محاليل التمديد، الليبوبروتينات منخفضة الكثافة، البرولين، كباش العواس.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the efficiency of combination amino acid proline with Low-Density Lipoproteins (LDL) into local semen extender for Awassi rams. Semen was collected three times per week during the breeding season by the means of artificial vagina from 4 three-year Awassi rams with body weight 75±3 KG.
Semen was frozen in liquid nitrogen -196 C_o in five extenders: AndroMed (control), sodium citrate-glucose with 20% egg yolk (v/v) and proline at two concentrations 25 and 50 mM (EY+25P, EY+50P), sodium citrate-glucose with 8% LDL (w/v) and proline at two concentrations 25 and 50 mM (LDL+25 P, LDL+50 P). Motility and live-dead sperms were evaluated at each step of semen handling by using phase contrast microscope and eosin-nigrosin staining technique for differential live - dead spermatozoa . CASA system was used to evaluate the frozen semen motility parameters. The percentages of live sperms estimated under eosin-nigrosin staining technique were 66.40, 62.10, 60.70, 58.50 and 56.71 % in LDL+25P, LDL+50P, AndroMed®, EY+25P, and EY+50P respectively. The extender containing 8% LDL and 25mM proline was significantly superior (P<0.001) to other experimental extenders.
The results of semen analysis by CASA system showed that there were significant differences (P<0.001) in the studied extenders. Motility was 64.97, 60.30, 59.02, 56.40 and 53.51% in LDL+25P, LDL+50P, AndroMed®, EY+25P, and EY+50P respectively. The progressive motility was 47.18, 44.86, 45.37, 42.14, and 39.85% respectively. There was a significant difference among extenders (P<0.001) in term of VCL 90.8, 81.49, 82.57, 85.19, and 83.88um/s respectively.
The conclusion from this study is that the combination of amino acid proline with LDL fractions are synergistic, they have a cryoprotective effect and significantly enhanced motility parameters of frozen-thawed Awassi ram semen.
Keywords: Semen, Extenders, Low Density Lipoproteins, Proline, Awassi ram.

المقدمة

تحظى تقانة التلقيح الاصطناعي وحفظ السائل المنوي المجمد بأهمية كبيرة، نظراً لاستخدامها في نشر التراكيب الوراثية المرغوبة بشكل سريع ومدروس، فتدفق الملايين من قشات السائل المنوي المجمد عبر الحدود، حَقق ثورةً في قطاع إنتاج الأبقار، سواء على المستوى العلمي، أو على صعيد زيادة العائد الاقتصادي، لكن ما زال استخدام هذه التقانة في الأغنام محدوداً نظراً لتأثرها بعدد من المعوقات، فالبنية التشريحية لعنق الرحم تعيق إيداع السائل المنوي في عمق الرحم باستخدام أدوات التلقيح الاصطناعي التقليدية (Kershaw وزملاؤه، 2005).

كما تُصنف نطاف الكباش بكونها حساسة لعمليتي التجميد والإذابة مقارنةً بمثيلاتها عند أنوع حيوانية أخرى كالثيران، والأرانب وحتى لدى البشر (Watson وزملاؤه، 1981؛ Fiser وFairfull، 1989). وتعود هذه الحساسية إلى الاختلاف في نسبة وتركيب الليبيدات ضمن الغشاء البلاسمي للنطاف، إذ تكون نسبة الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة إلى الأحماض الدهنية المتعددة المشبعة مرتفعةً في الغشاء البلاسمي لنطاف الكباش، في حين تكون نسبة الكوليسترول إلى الفوسفوليبيدات منخفضة (Evans وMxwell، 1989)، ولذلك فهي تكون عُرضةً للتأثيرات السلبية للصيغ الأكسجينية النشطة المشار إليها اختصاراً ROS (Reactive oxygen specie). هذه التعديلات غير القابلة للإصلاح على المستوى الفيزيولوجي والوظيفي للنطاف عند الكباش، تسبب تدهوراً في حركية النطاف وحيويتها وسلامتها الأكروزومية (Salamon وMaxwell،

Medeiros ،2000 وزملاؤه، 2002)، فعملية التجميد تسبب إجهادات حرارية وميكانيكية وكيميائية وأسموزية تتعرض لها النطاف أثناء عملية الحفظ بالتجميد (Watson وزملاؤه،1981؛ Fiser و Fairfull،1989؛ Hammerstedt وزملاؤه، 1990). إلا أنه يُمكن تقليص هذه الأذيات غير العكوسة وغير القابلة للإصلاح من خلال استخدام محاليل تمديد مناسبة وإضافات واقية من أخطار التجميد (Gil وزملاؤه،2003؛ Jeyendran وزملاؤه، 2008). ويُستخدم صفار البيض بشكل شائع في محاليل تمديد السائل المنوي المعد للتجميد (Moussa وزملاؤه، 2002)، فهو يقوم بالإضافة إلى الغليسرول بالمحافظة على سلامة الغشاء البلاسمي من تأثير صدمة البرد خلال عمليتي التجميد والإذابة بالاعتماد على مكوناته من الفوسفوليبيدات والكوليسترول والليبوبروتينات منخفضة الكثافة (LDL) (Muino وزملاؤه، 2007؛ Hu وزملاؤه، 2010). إلا أن لاستخدامه لهذا الغرض عدداً من المساوئ، فهو منتج من أصل حيواني قد ينطوي استخدامه على مخاطر صحية (-Van Wagtendonk De Leeuw وزملاؤه، 2000؛ Vishwanath وShannon، 2000)، وقد يسبب إمكانية التلوث الجرثومي لقشات السائل المنوي المعد للتلقيح الاصطناعي، وهذا ما يخفض القدرة الإخصابية للحيوانات المنوية (Aires وزملاؤه، 2003).

فمن الممكن تلوث البيض بدرجات متفاوتة ببكتيريا السالمونيلا أو *Staphylo-Cocci* (Bousseau وزملاؤه، 1998). وتمكن Cappucci وزملاؤه (1985) من عزل فيروس أنفلونزا الطيور من صفار بيض دجاج مصاب بهذا الفيروس. وأن مثل هذا التلوث الجرثومي أو الفيروسي يُعدّ عاملاً محدداً للقدرة الإخصابية للسائل المنوي المعد للتلقيح الاصطناعي.

علاوةً على ذلك يوصف صفار البيض بأنه ذو تركيب كيميائي معقد للغاية، تتغير وتختلف محتوياته باختلاف سلالات الدجاج، كما يختلف محتوى الليبيدات في الصفار باختلاف نوع العليقة المقدمة لقطيع الدجاج (Watson، 1976). ويحتوي صفار البيض مواداً تثبط العمليات التنفسية في النطاف، وتقلص من حركيتها (Kampschmidt وزملاؤه، 1953؛ Watson وMartin، 1975)، لهذا فإن استبعاد المكونات الضارة الموجودة في صفار البيض، واستخدام المكون المسؤول عن حماية النطاف أثناء عمليتي التجميد والإذابة يُعدّ أمراً مفيداً، وقد أشارت الدراسات إلى أن الليبوبروتين منخفض الكثافة (LDL) هو المكون الفعال في صفار البيض ذو التأثير الواقي من البرودة (Moussa وزملاؤه، 2002). فاستخدام LDL بتركيز 8 % (وزن/حجم) عوضاً عن صفار البيض الكامل يحّسن مؤشرات الحركية بعد الإذابة للسائل المنوي المجمد للثيران (Moussa وزملاؤه، 2002)، والماعز (Al Ahmad وزملاؤه، 2008).

من جهة أخرى يمكن تقليص الأضرار التي تتعرض لها النطاف نتيجة عمليتي التجميد والإذابة من خلال التشارك بين عدة واقيات برودة في محلول التمديد (Amann وPickett، 1987)، كما أن واقيات برودة شائعة الاستخدام في محاليل تمديد السائل المنوي، ولاسيما الغليسرول تمتاز بأن لها أثراً سمياً في النطاف (Katkov وزملاؤه، 1998؛ Garner،1991)، وإن هذه السمية الخلوية التي تنتج عن واقيات التجمد قادت العلماء للبحث عن مواد لها تأثير واقٍ من البرودة وذات أثر أقل سمية في الخلايا (Bencharif وزملاؤه، 2010).

ويعود استخدام الأحماض الأمينية كواقيات تجمد في محاليل تمديد السائل المنوي، نتيجةً لاكتشاف الدور الحيوي الذي تُؤديه الأحماض الأمينية في حماية بنية الخلية من الضرر الناتج عن عملية التجميد (Chu وزملاؤه، 1974)، إذ لوحظ قيام بعض النباتات كالذرة (Withers وKing، 1979)، والحيوانات (Anchordoguy وزملاؤه، 1988) بتجميع الحمض الأميني البرولين كرد فعل على انخفاض درجات الحرارة، فالأحماض الأمينية تؤدي دوراً مُهماً في حماية البنية الخلوية من الضرر الناشئ عن عمليتي التجميد والإذابة (Amirat وزملاؤه، 2009). وقد أنجزت عدة دراسات لتقييم فاعلية أنواع مُتعددة من الأحماض الأمينية كواقيات تجمد عند حفظ السائل المنوي بالتجميد لعدة أنواع حيوانية كالماعز (Atessahin وزملاؤه، 2008؛ خلوف، 2014)، والخنازير (Szczesniak-Fabianczyk وزملاؤه، 2006)، والثيران (Bilodeau وزملاؤه، 2001) والجواميس (EL-sheshtawy وزملاؤه، 2008)، والخيول (Trimeche وزملاؤه، 1999). وقد أشار Sanchez-partida وزملاؤه (1992) إلى أن التراكيز المنخفضة من البرولين (50 ميللي مول) قد حَسّنت من حركية النطاف المجمدة للكباش بعد الإذابة. وبيّن Kruuv وGlofcheski (1992) قدرة الأحماض الأمينية مثل الغلوتامين، والبرولين، والآلانين على حماية الخلايا الفيبرينية (الليفية) (Fibrobalsts) للهامستر الصيني أثناء الحفظ بالتجميد، وتوصلوا إلى أن أحماض الغلوتامين والبرولين قد أعطت أفضل حماية عند استخدامها بتراكيز 10 إلى 40 ميللي مول. كما أوضح LI وزملاؤه (2003) أن استخدام البرولين بتركيز 5 ميللي مول، والغلايسين والغلوتامين بتركيز 10 ميللي مول لكل منهما قد حَسّن وبشكل كبير السلامة الأكروزومية والحركية بعد الإذابة لنطاف القردة من فصيلة الرباح (*Macaca fasicularis*).

وأوضح Kundu وزملاؤه (2001) عند تجميد نطاف الماعز المأخوذة من نهاية البربخ Caudua epididymal بمحلول تمديد خال من صفار البيض والغليسرول، أن الأحماض الأمينية (L-Proline، L-alanine، L-glutamine، glycine) المستخدمة بتركيز 100 إلى 150 ميللي مول قد أظهرت تأثيراً واقياً من البرودة، إذ بلغت الحركية العامة 11 إلى 19 % ، والحركية التقدمية 8 إلى 14 % مقارنةً بانعدام الحركية كلياً في محلول التمديد الخالي من الأحماض الأمينية وواقيات البرودة التقليدية (صفار البيض، الغليسرول)، كما حسنت قُدرة الغليسرول على حماية النطاف المجمدة من تأثير صدمة البرد بمقدار 8 إلى 12 % عند إضافة الأحماض الأمينية إلى محلول التمديد، وكانت أفضل نتائج

الحركية (43 ± 3 %) عند إضافة البرولين بتركيز 20 ميللي مول إلى محلول التمديد مقارنة بالأحماض الأمينية الأخرى.

هدف البحث

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم فعالية مشاركة الحمض الأميني البرولين بتراكيز مختلفة مع جزيئات الليبوبروتينات منخفضة الكثافة المستخلصة من صفار البيض المضافة إلى محلول تمديد محلي مخصص لتجميد السائل المنوي لأغنام العواس في مواصفات السائل المنوي المخبرية.

مواد البحث وطرائقه

1 - مكان وتاريخ إجراء البحث:

نُفذ البحث خلال الموسم التناسلي لعام 2013 في مختبر التلقيح الاصطناعي ونقل الأجنة في محطة بحوث ازرع في محافظة درعا (سورية)، التابعة للمركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (أكساد/ACSAD)، ومختبر التلقيح الاصطناعي ونقل الأجنة في كلية الطب البيطري في محافظة حماة/سورية.

2 - استخلاص جزئياتLDL من صفار البيض:

تم استخلاص جزيئات الـ LDL من صفار البيض حسب طريقة Moussa وزملائه (2002) كالآتي:

كُسرت يدوياً بيوض دجاج طازجة خلال 24 ساعة على الأكثر من وضعها، ثم فُصل الصفار عن ألبومين البيض، ودوّر بعناية كبيرة على ورق ترشيح لإزالة أربطة المح (شرائط ألبومينية) وبقايا الألبومين الملتصقة على الغشاء المحي، ثم جُرح الغشاء المحي بوساطة نصلة مشرط طبي معقم، وَسكب الصفار في دورق على درجة حرارة 4+ مº لمنع نمو وتكاثر الجراثيم. ثم مُدد صفار البيض السابق في محلول فيزيولوجي (0.9 % من NaCl) بنسبة 1:1 (حجم : حجم)، وَحُرّك لمدة ساعة على درجة حرارة 4+ مº على هزاز مغناطيسي لموازنة المحلول قبل التثفيل بسرعة 10000 × g لمدة 45 دقيقة على درجة حرارة 4+ مº، حيث انفصل القسم الطافي (البلازما) عن الراسب (الحبيبات)، ثم تم تثفيل البلازما مرةً ثانيةً لإزالة كل آثار الحبيبات، ومُزجت بعد ذلك البلازما مع 40 % من سلفات الأمونيوم (Sigma A: 4418) حتى الإشباع (مُكافئ إلى 20,5 غ لكل 100 مل من البلازما) لترسيب بروتينات الليفيتين (Livetins). وَعُدل الـ pH وضبط خلال كل فترة الاستخلاص. بعد ساعة واحدة من التحريك في درجة حرارة 4+ مº، ثُفل المزيج على السرعة 10000 × g لمدة 45 دقيقة، واستُبعد الراسب وتمت ديلزة (Dialyse) القسم الطافي بالماء المقطر لإزالة سلفات الأمونيوم باستعمال غشاء الدياليز (MCL 8 x 100 CLR) (-Sigma D: 9527). أثناء عملية الديلزة (Dialyse)، تُحرض عملية خروج سلفات الأمونيوم من بودان الدياليز على تكون راسب غني بالبروتينات الدهنية مُنخفضة الكثافة. بعدها ثُفل المحلول بسرعة 10000 × g لمدة 45 دقيقة على درجة حرارة 4+ مº ثم جُمع الراسب المتشكل الغني بالبروتينات الدهنية منخفضة الكثافة.

3 - جمع السائل المنوي ومداولته:

جُمع السائل المنوي بوساطة المهبل الاصطناعي من أربع طلائق تلقيح اصطناعي من أغنام العواس بعمر 3 سنوات، وبمتوسط وزن 75 ±3 كغ. كررت عملية الجمع ثلاث مرات أسبوعياً طوال الموسم التناسلي وبمعدل قذفتين من كل كبش في كل يوم جمع، وعلى اعتبار أن الذكور المستخدمة مَدروسة ولا يوجد فرق معنوي في مواصفات سائلها المنوي فقد تم دمج جميع القذفات للذكور الأربعة في كل يوم جمع، وقُسمت إلى المعاملات المدروسة لتمديدها بعدة محاليل تمديد.

4 - محاليل التمديد المستخدمة في تجميد السائل المنوي:

تم تمديد السائل المنوي لكباش العواس بخمسة أنواع من محاليل التمديد، أربعة منها محلية التحضير وواحد مستورد، كما هو موضح في الجدول 1، إذ استُخدمت عدة أنواع من المحاليل لتمديد وتجميد السائل المنوي هي:

- الأول: محلول تمديد محلي الصنع (3.52 غ سترات الصوديوم مع 8 % LDL)، أضيف إليه الغليسيرول بتركيز 6.4 %، والحمض الأميني البرولين (L-Proline) بتركيزين: 25 ميللي مول/مل و 50 ميللي مول/مل (Sigma St Louis، MO، USA).
- الثاني: محلول تمديد محلي الصنع (3.52 غ سترات الصوديوم مع 20 % صفار البيض الكامل)، أضيف إليه الغليسيرول بتركيز 6.4 %، والبرولين بتركيزين: 25 ميللي مول/مل و50 ميللي مول/مل وأضيف لكل المحاليل التجريبية نوعان من الصادات الحيوية هما البنسلين (500 وحدة دولية/مل)، والستربتومايسين (1 ملغ لكل 1 مل).
- كما استخدم محلول تجاري جاهز (**AndroMed**، Minitube، Tiefenbach، Germany) كمحلول شاهد قياسي، إذ تمت إضافة جزء من المحلول الجاهز إلى أربعة أجزاء من الماء مضاعف التقطير (معدل التمديد 1: 4). عُدلت درجة الحموضة pH لجميع المحاليل الى 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).

	محلول شاهد قياسي	المحاليل التجريبية			
المحلول	أندروميد	LDL8% +25 ميللي مول برولين LDL+25P	LDL8% +50 ميللي مول برولين LDL+50P	صفار بيض 20 % +25 ميللي مول برولين EY+25P	صفار بيض 20 % +50 ميللي مول برولين EY+50P
المكونات الأساسية	ANDROMED	3.52غ سترات الصوديوم	3.52غ سترات الصوديوم	3.52 غ سترات الصوديوم	3.52 غ سترات الصوديوم
		8 % LDL	8 % LDL	20 % صفار بيض	20 % صفار بيض
		25 ميللي مول برولين	50 ميللي مول برولين	25 ميللي مول برولين	50 ميللي مول برولين
		6.4 % جليسيرول	6.4 % جليسيرول	6.4 % جليسيرول	6.4 % جليسيرول
		194 ملغ غلوكوز	194 ملغ غلوكوز	194 ملغ غلوكوز	194 ملغ غلوكوز

5 - تجميد السائل المنوي:

بعد تمديد السائل المنوي بالحجم المناسب من محاليل التمديد نقلت العينات مباشرة إلى براد أفقي (+4 م°)، وتم تزويد آلة تعبئة القشات وإغلاقها ـ والموجودة في البراد نفسه ـ بالمعلومات الخاصة حول نوع كل محلول تمديد وتاريخ التعبئة، وبعد انقضاء ساعتين ونصف (فترة التوازن والتبريد) عُبئَ السائل المنوي في قشات سعتها 0.5 سم^3 مصنوعة من الكلوريد بوليفينيل إنتاج شركة (IMV، L Aigel، France) لتغلق آلياً وهي في البراد، ثم وضعت القشات المعبأة على حامل معدني خاص يتسع لـ 40 قشة، وتركت في البراد حتى نهاية عملية التعبئة والإغلاق لبقية القشات. شُغل نظام التجميد الآلي (حاسب، منظم آلي، خزان سائل أزوتي مضغوط، حجرة تجميد)، واتُبعت تعليمات التشغيل الموصى بها من قبل الشركة الصانعة (IMV، L Aigel، France) المتضمنة عدة خطوات تؤدي إلى خفض درجة حرارة السائل المنوي الممدد من +4 م° الى -140 م°، وهذا ما يدعى بالتجميد الأولي، ثم نُقلت القشات المجمدة أولياً في البداية إلى وعاء من الستريوبور مملوء بالسائل الآزوتي، لتتم فيه عملية التجميد النهائي، ومنه نقلت القشات المجمدة إلى الحامل المخصص لها في خزان السائل الآزوتي وفقاً لنوع محلول التمديد المستخدم.

6 - تقييم السائل المنوي:

التقييم المجهري: قيم السائل المنوي من حيث نسبة الحركية، والنطاف الميتة والحية في كل مرحلة من مراحل مداولته (طازج ومبرد ومجمد)، باستخدام مجهر تباين الأطوار (Phase contrast microscope)، وصبغة أيوزين ـ نيكروسين لتمييز النطاف الحية عن الميتة، وكذلك استخدم جهاز CASA لتقييم السائل المنوي المجمد بعد الإذابة.

التحليل الآلي لمؤشرات السائل المنوي المجمد باستخدام جهاز CASA:

حُللت خمس قشات من كل ممدّد بمساعدة نظام تحليل السائل المنوي الـ Sperm (Computer-assisted semen analysis - CASA) Vision® 3.5 (Minitüb، Tiefenbach، Germany) الموجود في مختبر التلقيح الاصطناعي ونقل الأجنة في كلية الطب البيطري في محافظة حماة (سورية). حيث أخذ 2.5 µL من العينة ووُضعت في الحفرة الخاصة بها على الشريحة المدفئة على درجة حرارة 37 م°، وتم قياس:

- **التركيز** .
- **الحركية** (Motility).
- **الحركة التقدمية الأمامية** (Progressive) .
- **مؤشرات الحركة التقدمية الأمامية** وهي:

معدل مسافة المسار (Distance Average Path- µm) DAP.

مسافة الخط المنحني (Distance Curved Line- µm) DCL.

مسافة الخط المستقيم(Distance Straight Line- µm) DSL.

معدل سرعة المسار(Velocity Average Path- µm /sec) VAP.

السرعـة الخَطِّيـة المنحنية (Curvilinear Line Velocity-µm/s) VCL.

السرعـة الخَطِّيـة المستقيمـة أو التقدميـة (Straight Line Velocity-µm/s) VSL.

المـدى الجانبـي لضربـات الـرأس (Lateral Head Displacement-µm) ALH.

7 - التحليل الإحصائي:

تم تحليل البيانات وفق التصميم العشوائي الكامل، باستخدام الأنموذج الخطي العام (GLM) (General Linear Model)، 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 الأنموذج الخطي التالي لتقدير تأثير المعاملات في المؤشرات المدروسة:

$$Y_{ijk}= \mu + E_i+H_j+ e_{ijk}$$

حيث:

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

μ: المتوسط العام للمؤشر المدروس.

E_i: تأثير المدد المختبر حيث i= 5,4,3,2,1

H_{ki}: تأثير مرحلة المداولة حيث j= 1،2 (بعد التبريد وبعد الإذابة).

E_{ijk}: وحدة الخطأ العشوائي المرتبطة مع Y_{ijk}، والتي من المفترض أن تكون مستقلةً وموزعةً طبيعياً بمتوسط صفر وتباين $I\sigma^2e$.

النتائج والمناقشة

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

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي (الجدول 2) لاستخدام صبغة ايوزين ـ نيكروسين في تلوين النطاف تفوقاً معنوياً (P<0.001) لمحلول التمديد الحاوي على الحمض الأميني برولين بتركيز 25 ميللي مول، والليبوبروتينات منخفضة الكثافة (LDL) في نسبة النطاف الحية مقارنةً بالمحاليل الأخرى المستخدمة في التجربة.

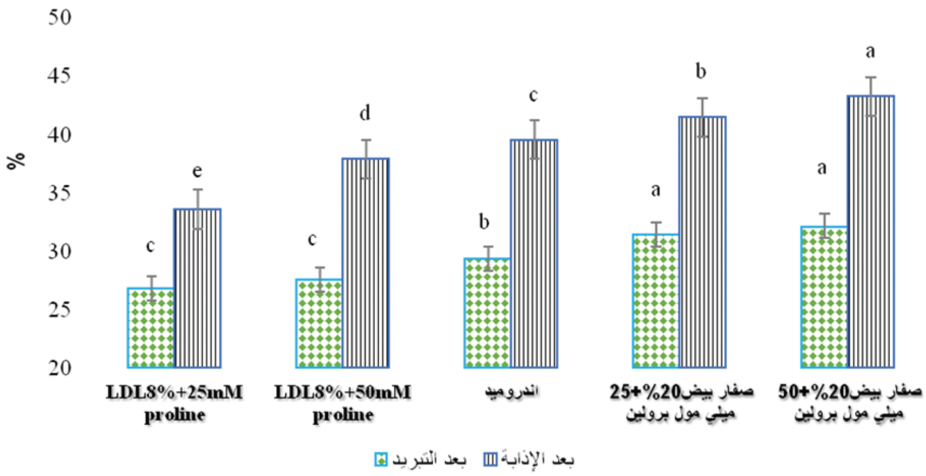
ففي نهاية مرحلة التوازن بلغت نسب النطاف الحية (73.2 و72.4 و70.7 و68.2 و67.9 %) في محاليل LDL+25P، و LDL+50P، والأندروميد، وEY+25P، و EY+50P على التوالي. وقد أورد White (1993) أن عملية تبريد النطاف إلى درجة 4 ° م تسبب حدوث فقد في فوسفوليبيدات الغشاء البلاسمي مما يسبب تدهوراً في استقرار وثبات الغشاء البلاسمي. والملاحظ في هذه المرحلة أنه لم يكن لتركيزي البرولين (50 و25 ميللي مول) ضمن محلول تمديد LDL أي تأثير معنوي (P<0.001) في نسبة النطاف الحية والميتة، وكذلك ضمن محلول التمديد المضاف له صفار البيض، مما يشير إلى أن ارتفاع نسبة النطاف الحية في محلولي تمديد LDL+25P وLDL+50P في نهاية مرحلة التوازن مقارنة ببقية المحاليل، كان سببه الليبوبروتينات منخفضة الكثافة (LDL). وبشكل مشابه أورد Vera-munoz وزملاؤه (2011) أن الليبوبروتينات منخفضة الكثافة (LDL) قد حافظت على سلامة الغشاء البلاسمي، والغشاء الأكروزومي، وحركية نطاف الثيران عند

حفظها بالتبريد لمدة 48 ساعة، إذ كانت قيم هذه المؤشرات قريبة لمؤشرات السائل المنوي الطازج.

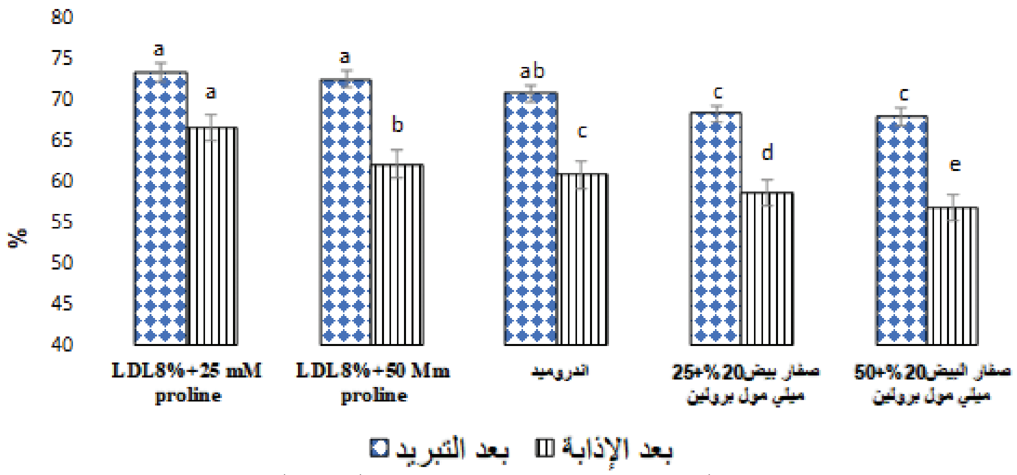
بالمقابل انخفضت نسبة النطاف الحية بعد التجميد والإذابة إلى 66.40 و62.10 و60.70 و58.50 و56.71 % في محاليل LDL+25P وLDL+50P والأندروميد وEY+25P وEY+50P على التوالي (الشكل 1). وعند مقارنة مقدار الانخفاض في حركية النطاف بين مرحلتي المداولة (بعد التبريد وبعد الإذابة) للسائل المنوي، باستخدام مجهر تباين الأطوار لوحظ أن الانخفاض في نسبة الحركية قد بلغ 9.2 % في محلول التمديد LDL+25P، في حين بلغ هذا الانخفاض أقصاه (16.14 %) في محلول التمديد EY+50P (الشكل 2). أثبت اختبارالتقييم للحركية والنطاف الميتة باستخدام مجهر تباين الأطوار تفوقاً معنوياً ($P<0.001$) لمحلول السترات المضاف إليه LDL بتركيز 8 % (وزن/حجم)، والبرولين بتركيز 25 ميللي مول/ مل على بقية المحاليل المستخدمة في التجربة بما فيها محلول الأندروميد القياسي في مرحلتي المداولة المختبرتين (الشكلان 1 و 2).

الجدول 2. تحليل التباين لتأثير محاليل التمديد في الحركية، ونسبة النطاف الميتة في السائل المنوي الممدد خلال المراحل المتتابعة لمداولة السائل المنوي لكباش العواس (التقديران باستخدام مجهر تباين الأطوار).

مصدر التباين	درجات الحرية (DF)	متوسط المربعات الصغرى	
		الحركية (%)	النطاف الميتة (%)
محاليل التمديد	4	33.43***	4.33***
مرحلة المداولة	1	116***	3.37***
الخطأ التجريبي	24	1.29	1.97



الشكل 1. المتوسطات والانحرافات لنسب النطاف الميتة (%) خلال مرحلتي مداولة السائل المنوي في محاليل التمديد المدروسة مقدرة باستخدام مجهر تباين الأطوار والتلوين بصبغة أيوزين- نيكروسين القياسية.



الشكل 2. المتوسطات والانحرافات لنسب الحركية (%) للنطاف خلال المراحل المتتابعة لمداولة السائل المنوي في محاليل التمديد المدروسة مقدرة باستخدام مجهر تباين الأطوار.

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

أظهرت دراسة مؤشرات حركية النطاف في السائل المنوي المجمد بعد الإذابة بوساطة جهاز CASA تفوقاً معنوياً (P<0.001) لمحلول التمديد LDL+25P مقارنةً ببقية المحاليل (الأشكال 3 و4 و5). وتعود أهمية هذا الجهاز المتطور من كون استخدامه يُسهم في الغاء الأخطاء في تقدير المؤشرات التي ترتبط بالعامل البشري، إضافة لذلك فقد وجد Januskauskas وزملاؤه (2003) أن هناك ارتباطاً معنوياً بين مؤشرات الحركية المقدرة بوساطة هذا الجهاز مع الخصوبة الحقلية.

بلغت الحركية في هذه الدراسة بعد التجميد والإذابة مقدرة بوساطة جهاز CASA 64.97 % في محلول التمديد LDL+25P، في حين بلغت 60.30 و 59.02 و 56.40 و53.50 % في محاليل LDL+50P، والأندروميد، و EY+25P و EY+50P على التوالي (الشكل 3). وبلغت نسبة الحركة التقدمية 47.18 % في محلول التمديد LDL+25P، في حين بلغت 44.86 و 45.37 و 42.14 و 39.85 % في محاليل التمديد LDL+50P، والأندروميد، و EY+25P، و EY+50P على التوالي (الشكل 3). ولهذا التفوق المعنوي أهميته التطبيقية والاقتصادية، فمن المعلوم أن حركية النطاف تُعّد المؤشر الأكثر أهميةً في تقدير القدرة الإخصابية للسائل المنوي (Liu وزملاؤه، 1991).

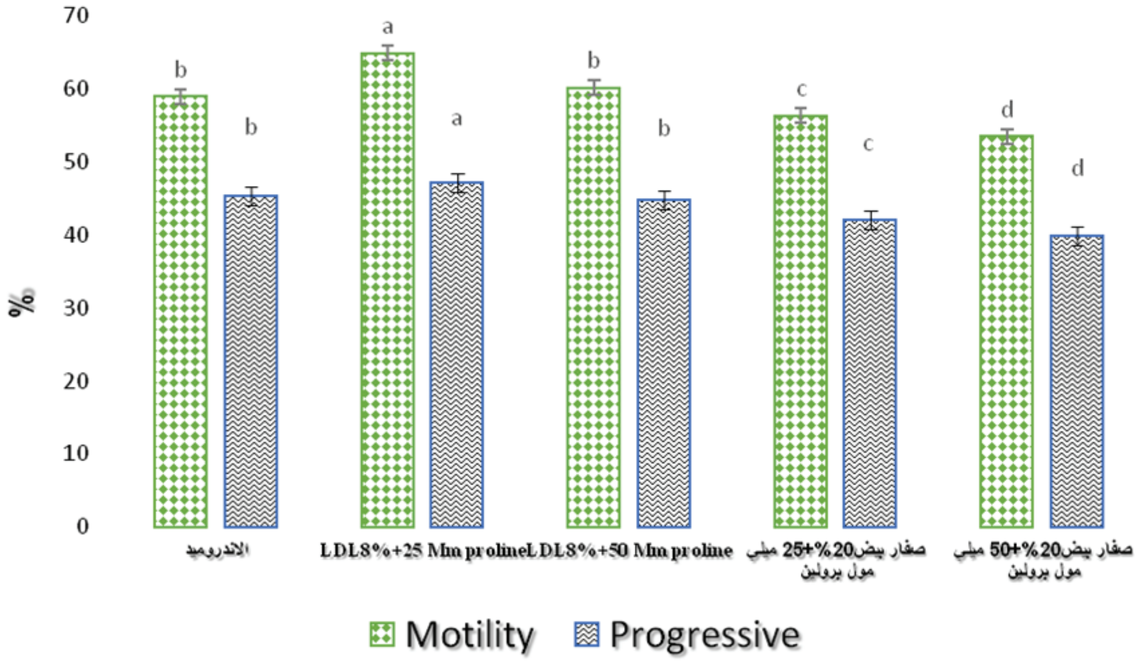
وتبين وجود فرق معنوي (P<0.001) في المؤشرات المتعلقة بالمسافات المقطوعة من قبل النطاف في الحقل المجهري، فقد بَلَغ مُعدل مسافة الخط المنحني (DCL) 32.69 و 38.08 و 36.73 و 35.90 و 36.08 ميكروميتر في محاليل LDL+25P، و LDL+50P، و الأندروميد، و EY+25P و EY+50P على التوالي. وبلغ معدل مسافة الخط المستقيم (DSL) 16.63 و 18.29 و 16.87 و 17.57 و 16.81 ميكروميتر في محاليل LDL+25P، وLDL+50P، والأندروميد، و EY+25P و EY+50P على التوالي، وبلغ معدل مسافة المسار (DAP) 22.2 و 25.44 و22.01 و 24.27 و 24.07 ميكروميتر في محاليل LDL+25P، و LDL+50P، و الأندروميد، و EY+25P و EY+50P على التوالي، وكان لنوع محلول التمديد تأثير معنوي (P<0.001) في التنقل الجانبي لضربات رأس النطاف (ALH)، إذ تفوق معنوياً محلول الاندروميد مقارنةً ببقية المحاليل المختبرة، وكانت قيم ALH 4 و 4.37 و 4.89 و 4.24 و 4.16 ميكرومتر في محاليل LDL+25P، و LDL+50P، والأندروميد، و EY+25P و EY+50P على التوالي (الشكل 4). ويُعّد ALH مؤشراً يشير إلى الحركة السوطية للنطاف (Indicator of flagellar pattern)، ويترافق الانخفاض في قيمته مع الانخفاض في مستوى الكالسيوم الخلوي في نطاف الهامستر (Surez وزملاؤه، 1993)، فهو يُعبر عن قدرة النطاف على اجتياز المخاط في قرن الرحم والاتحاد مع البويضة (Verstegen وزملاؤه، 2002)، وأشار Gadea (2005) إلى أهمية ALH عند الخنازير لإتمام اختراق النطاف للطبقات المحيطة بالبويضة كطبقة الخلايا الركامية (Cumulus cells)، والغشاء الشفاف (Zona pellucida).

وبلغت قيمة السرعة الخطية المستقيمة VSL 44.03 ميكروميتر/ثانية في محلول LDL+25P، حيث تفوق معنوياً على بقية المحاليل عدا محلول صفار البيض المضاف له البرولين بتركيز 25 ميللي مول/مل، ولم يلحظ أي فرق معنوي بين المحلولين، وبلغت القيم 40.27 و 39.42 و 41.3 و 38.54 ميكروميتر/ثانية في محاليل LDL+50P، و الأندروميد، و EY+25P و EY+50P على التوالي، كما أظهرت نتائج مؤشرات سرعة الحركة (VAP و VCl و VSL)، عدم وجود فروق معنوية (p>0.05) في معدل سرعة المسار (VAP) بين المحاليل المستخدمة. في حين أظهر محلول التمديد LDL+25P وبشكل واضح تفوقاً معنوياً (P<0.001) في مؤشر معدل السرعة المنحنية (VCL) على معظم المحاليل (عدا محلول EY+25P)، إذ لم يلحظ بينهما أي فرق معنوي، كذلك لم يلحظ أي فرق معنوي بين المحاليل الأربعة الأخرى في هذا المؤشر، وبلغت القيم 90.80 و 81.49 و 82.57 و 85.19 و 83.88 ميكروميتر/ثانية في محاليل LDL+25P، وLDL+50P، والأندروميد، و EY+25P و EY+50P على التوالي (الشكل 5).

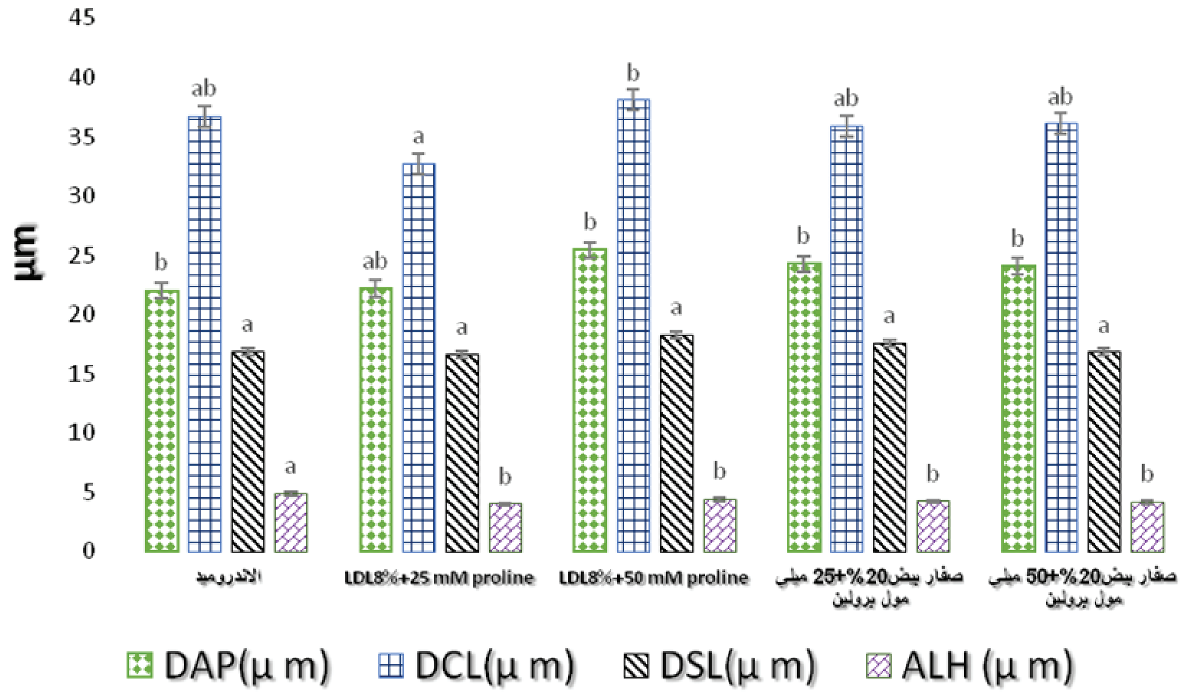
وأشارت دراسات أُخرى إلى الإرتباط الإيجابي بين مُؤشر السرعة الخطية المستقيمة (VSL) ومُعدل الولادات لدى أنواع حيوانية عديدة كالخنازير (Holt وزملاؤه، 1997)، والدجاج (Mclean وزملاؤه، 1997)، والرومي (King وزملاؤه، 2000)، والانسان (Liu وزملاؤه، 1991)، كما أوضح Verstegen وزملاؤه (2002) أن المؤشرات التي تميز سرعة النطاف (VCL و VSL) ترتبط بقدرتها الإخصابية، كما ظهر عند الكباش (Sanchez-Partida وزملاؤه، 1992)، والثيران (Farrell وزملاؤه، 1998)، والإنسان (Giwercman وزملاؤه، 2003).

تؤكد هذه النتائج أن الجزء المسؤول في صفار البيض عن حماية النطاف خلال مراحل التجميد والإذابة هو الليبوبروتينات منخفضة الكثافة، وقد أشار Graham و Foote (1987) إلى أن LDL تحيط بالغشاء البلاسمي للنطاف وتُؤمن الحماية لها من صدمة البرد (Cold shock) وأوضح Moussa وزملاؤه (2002) أن خاصية الادمصاص (adsorption) والالتصاق (gelation) التي تتصف بها جزيئات LDL تمكنها من تشكيل طبقة حول الغشاء الخلوي للنطاف، الأمر الذي يُسهم في حمايتها من الضرر الناتج عن تشكل البلورات الثلجية أثناء التجميد. كما أكد Bergeron و Manjunath (2006) قدرة LDL على تخفيض الأثر الضار للبروتينات المرافقة للبلازما المنوية في سطح الغشاء البلاسمي للنطاف، إذ تعمل هذه البروتينات على الإرتباط بسطح الغشاء البلاسمي وتسبب تحرر الفوسفوليبيدات والكوليسترول من الغشاء البلاسمي (Thérien وزملاؤه، 1998 و 1999). وقد أظهرت التجربة امتلاك البرولين أثراً واقياً من البرودة عند استخدامه بتركيز 25 ميللي مول إلى جانب LDL المستخدم بتركيز 8 %، ويَعّد هذا التركيز أقل من التركيز الموصى باستخدامه من قبل Sanchez-partida وزملائه (1992) في

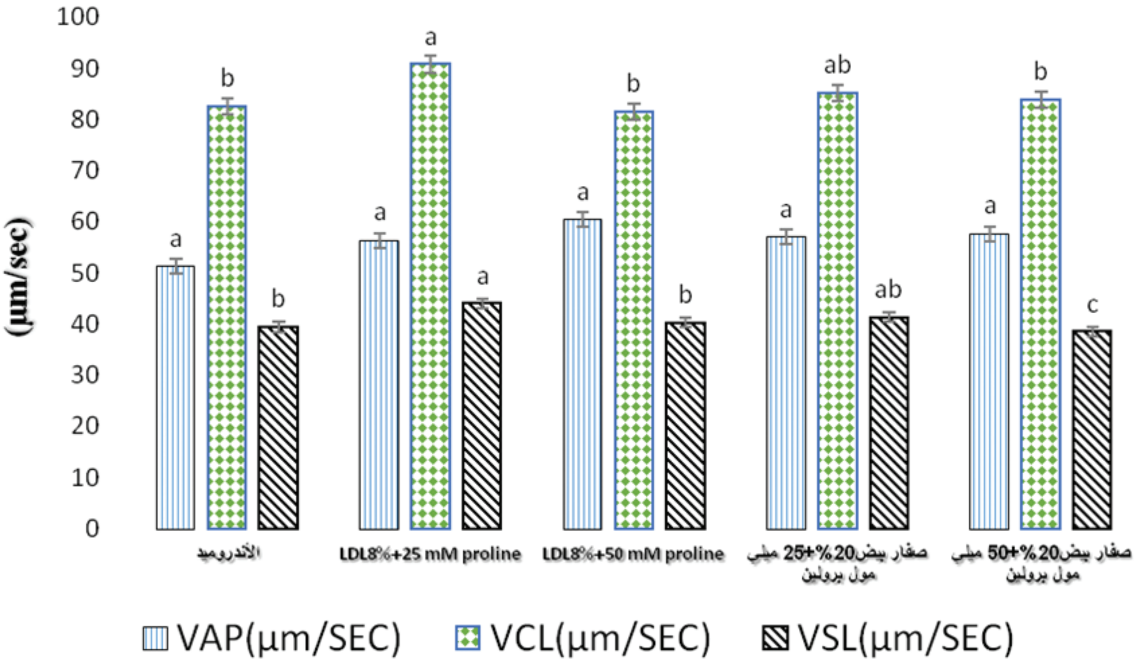
الكباش (50 ميللي مول برولين)، ويمكن أن يفسر ذلك نتيجة لاختلاف عرقي الأغنام بين التجربتين، واستخدام LDL عوضاً عن صفار البيض، فانخفضت نسبة البرولين الواجب إضافتها إلى محلول التمديد.



الشكل 3. قيم النسب المئوية للحركية (MOT)، والحركية التقدمية (PROG) للنطاف بعد التجميد والإذابة في محاليل التمديد المختلفة.



الشكل 4. قيم معدل مسافة المسار (DAP)، ومسافة الخط المنحني (DCL)، ومسافة الخط المستقيم (DSL)، والمدى الجانبي لضربات الرأس (ALH) للنطاف بعد التجميد والإذابة في محاليل التمديد المختلفة.



الشكل 5. قيم معدل سرعة المسار (VAP)، ومنحنى السرعة المنحنية (VCL)، والسرعة المستقيمة (VSL) للنطاف بعد التجميد والإذابة في محاليل التمديد المختلفة.

كما أشار Al -Ahmad وزملاؤه (2008) إلى أن جزيئات LDL بتركيز 8 % والحمض الأميني الغلوتامين بتركيز 25 ميللي مول تملكان فعلاً تآزرياً عند استخدامهما معاً في محاليل تمديد السائل المنوي للماعز، وقد أسهم هذا الأمر في تأمين حماية للنطاف المجمدة بعد الإذابة، ويبدو من هذا البحث أن العلاقة ذاتها موجودة بين LDL بتركيز 8 % والبرولين بتركيز 25 ميللي مول المستخدم في محاليل تمديد السائل المنوي لكباش العواس. حيث يُسهم هذا الأثر التآزري في تأمين قوة وتماسك الغشاء البلاسمي للنطاف خلال عمليتي التجميد والإذابة، فقد أشار Kundu وزملاؤه (2001) إلى أن جزيئات الأحماض الأمينية تملك نوعاً من التفاعل الكهربائي الساكن مع مجموعات الفوسفات التابعة لفوسفوليبيدات الغشاء البلاسمي للنطاف الأمر الذي يسبب تشكيل طبقة حول الغشاء البلاسمي تُؤمن حمايةً له من تأثير صدمة البرد، كما بين Rudolph وCrowe (1985) أن البرولين قد أسهم في تقليص الأضرار التي يتعرض لها الغشاء البلاسمي خلال التجميد، وثبط ظاهرة انكماش الجبلة الخلوية (Plasmolysis) من خلال تحقيق استقرار الغشاء الخلوي. وقد عزى Marsh وزملاؤه (1990) هذا الأمر لحمايتها طبقة الليبيدات في الغشاء البلاسمي، وصيانتها للنشاط التنفسي للميتوكوندريا. وذكر Carpenter وCrow (1988) أن الحمض الأميني البرولين يحمي أنزيم phosphofructokinase من التفكك (Denaturation) خلال التجميد.

الاستنتاجات و المقترحات:

- اعتماد محلول تمديد السائل المنوي المكون من سترات الصوديوم والغلوكوز، والمضاف له الحمض الأميني البرولين بتركيز 25 ميللي مول/مل والليبوبروتينات منخفضة الكثافة LDL بتركيز 8% (وزن/حجم).
- تقترح الدراسة تجميد السائل المنوي بمحلول (سترات الصوديوم +8% LDL+25 ميللي مول/مل برولين)، واستخدامه في التلقيح الاصطناعي لمعرفة نتائج الخصوبة الحقلية.
- القيام بدراسة تأثير استخدام LDL وأحماض امينية أخرى ضمن محاليل تمديد السائل المنوي للأنواع الحيوانية المنتشرة في القطر العربي السوري.

المراجع

خلوف، رامي. 2014. تأثير الغلوتامين والبرولين وفيتامين B12 في مواصفات السائل المنوي المجمد وقدرته الإخصابية في الماعز الشامي. أطروحة دكتوراه - جامعة دمشق - سورية.

- Aires,V.A., K.D. Hinsch, F. Mueller-Schloesser, K. Bogner, S. Mueller-Schloesser 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, 60:79 - 269.
- 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. Reprod Domest Anim; 43(4): 36- 429.
- Amann, R., and B. Pickett. 1987. Principles of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. Equine Vet Sci, 7:73 - 145.
- Amirat, L., D. Bencharif, O. Vera-Munoz, H. BelHadj Ali ,S.Destrumelle,S. Desherces, E,Schmidt, M.Anton, and D. Tainturier D. 2009. Effect of glutamine on post-thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low-density lipoproteins) extender: preliminary results. Theriogenology, 71:14 - 1209.
- Anchordoguy. T., J. F. Carpenter, S. H. Loomis, and J. H. Crow. 1988. Mechanisms of interaction of amino acids with phospholipids bilayers during freezing. Biochem Biophys Acta; 946: 299 - 306.
- Aires, V.A., K.D. Hinsch, F. Mueller-Schloesser, K. Bogner, S. Mueller-Schloesser, and F, Hinsch. 2003. In vitro and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. Theriogenology, 60: 269 - 279.
- Atessahin, A., M. N. Bucak, P. B. Tuncer and M. Kizil. 2008. Effect of antioxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze-thawing process. Small Rumin. Res. 77:38 - 44.
- Bencharif, D., L.Amirat, O.Pascal, M.Anton, E.Schmitt and S. Desherces. 2010. The dvantages of combining low-density lipoproteins with glutamine for cryopreservation of canine semen.Reprod Domest Anim ,45:189 - 200.
- Bergeron,A.,and P. Manjunath. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk.MolReprod Dev.,73:1338 -1344.
- Bilodeau, J. F., S. Blanchette, I.C. Gagnon and M. A. Sirard. 2001.Thiols prevent H2O2 - mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. Theriogenology 56:275 - 286.
- 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 H_5N_2) from chicken eggs during a natural outbreak. Avian Dis 9: 1195 -1200.
- Carpenter J., and J.Crow. 1988. The mechanism of cryoprotection of protein by solutes. Cryobiology 25: 244 - 255.
- Chu, T. M., D. Aspinall and L. G. Paleg. 1974. Stress metabolism:Part 6. Temperature stress and the accumulation of proline in barley and radish. Aust. J. Plant Physiol. 1:87 - 97.
- Duncan. D. R. 1995. Multiple range and multiple F test. J. Bomemetries; 11: 1 - 42.
- El-Sheshtawy, G., A. El-Sisy and W.S. El-Nattat. 2008. Use of Selected Amino Acids to Improve Buffalo Bull Semen Cryopreservation. Global Veterinaria, 2: 146 -150.
- Evans, G., and W.M.C. Maxwell. 1989. Artificial Insemination of Sheep and Goats, Butterworths, Sydney, Australia, 194 pp.

- Farrell. P., G. Presicce, C. Brockett, and R. Foote. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. Theriogenology; 49: 871 - 879.
- Fiser, P. S., and R.W. Fairfull. 1989. The effect of glycerolrelated osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. Cryobiology, 26: 64 - 69.
- Gadea, J. 2005. Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. Theriogenology, 63:431- 444.
- Garner, D. 1991. Artificial insemination. In: Cupps PT (ed.), Reproduction in domestic animals. Academic Press, San Diego: 251– 278.
- Gil, J., M. Rodriguez-Irazoqui, N. Lundeheim, L. Soderquist and H.Rodriguez-Martinez. 2003. Fertility of ram semen frozen in Bioxcell and used for cervical artificial insemination. Theriogenology, 59: 1157 - 1170.
- Giwercman, A., J. Richthoff, H. Hjollund, J. Bonde, K. Jepson, B. Frohm and M. Spano. 2003. Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. Fertil Steril, 80: 1404 - 1412.
- Graham, J.K., and R. H Foote. 1987. Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. Cryobiology, 24: 42 - 52.
- Hammerstedt, R. H., J. K. Graham, and J. P. Nolan. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. J. Androl, 11: 73– 88.
- Holt, C., W. V. Holt, H. D. M. Moore, H. C. B. Reed, and R. M.Curnock. 1997. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations:Results of two fertility trials. J. Androl, 18:312 - 323.
- Hu, JH., Q.W.Li ,L.S. Zan ,Z.L. Jiang ,J.H.An ,L.Q. Wang and Y.W. Jia. 2010. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing–thawing. Anim Reprod Sci, 117: 11 - 17.
- 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.
- Jeyendran, R., V.Acosta, S. Land, and C. Coulam. 2008. Cryopreservation of human sperm in a lecithin-supplemented freezing medium. Fertil Steril, 90: 1263 -1265.
- Kampschmidt, R.F., D.T. Mayer, and H.A. Herman. 1953. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. J Dairy Sci;36: 733 - 42.
- Katkov, I. I., N. Katkova, J. K. Crister and P. Mazur. 1998. Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: Chemical toxicity v. s. osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. Cryobiology; 37: 38 - 325.
- Kershaw, C.M., M. Khalid, R.M. McGowan, K.Ingram, S. Leethongdee, G. Wax and J.R. Scaramurazzi. 2005. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. Theriogenology, 64: 1225 -1235.
- King, L. M., D. R. Holsberger and A. M. Donoghue. 2000. Correlation of CASA velocity and linearity parameters with sperm mobility phenotype in turkeys. J. Androl, 21:65 - 71.
- Kruuv, J. and D. J. Glofcheski. 1992. Protective effect of amino acids against freeze- Thaw damage in mammalian cells. Cryobiology, 29: 291 - 295.
- Kundu. C. N., K. Das and G. C. Majumder. 2001. Effect of amino acids on cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. Cryobiology, 41: 21 - 27.
- Li, Y., W. Si, X. Zhang, A. Dinnyes and W. Ji. 2003. Effect of amino acids on cryopreservation of cynmolgus monkey (*macaca fascicularis*) sperm. Am. J. Primatol, 59:159 - 165.
- Liu, D. Y., C. N. Clarke, and H. W. Gordon Baker. 1991. Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates *in vitro*. J. Androl.12:231 - 239.

- Marsh, D.C., F.O. Blezer and J.H. Southard. 1990. Hypothermic preservation of hepatocytes: importance of Ca^{+2} and amino acids. Cryobiology, 27:1 - 8.
- McLean, D. J., L. G. Jones Jr, and D. P. Froman. 1997. Reduced glucose transport in sperm from roosters (*Gallus domesticus*) with heritable subfertility. Biol. Reprod. 7:791 - 795.
- Medeiros, C. M. O., F. Forell, A. T. D. Oliveira and J. L. Rodriguez. 2002. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better Theriogenology, 57: 327 - 344.
- 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. Theriogenology, 57: 1695 - 1706.
- Muino, R.,M. Fernandez and A.I. Pena. 2007. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. Reprod. In Dom. Anim, 42 (3): 305 - 311.
- Rudolph ,A.S., and J.H. Crowe. 1985. Membrane stabilization during freezing:the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. Cryobiology, 22:367 - 77.
- Salamon S, and W.M.C. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. Anim Reprod Sci, 62:77 - 111.
- Sanchez-Partida, L. G., W.M.C, Maxwell, L.G. Paleg, and B. P. Setchell . 1992. Proline and glycine betaine in cryoprotective diluents for ram spermatozoa. Reprod.Fertil. Dev. 4: 113 -118.
- SAS. 2008. User's guide statistics (Ver 9.2) SAS institute inc., cary, NC, USA.
- Surez, S.S., S.M. Varosi and X.B. Dai. 1993. Intracellular increases with hyperactivation in intact moving hamster sperm and oscillates with the flageller beat cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 4660 - 4664.
- Szczesniak-Fabianczyk, B., M. Bochenek, Z. Smorag and M. A.Silvestre. 2006. Effect of antioxidants added to boar semen extender on the semen survival time and sperm chromatin structure. Reprod. Biol. 3:81 - 87.
- Thérien, I., R. Moreau and P. Manjunath. 1998. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. Biol Reprod, 59: 768 - 776.
- Thérien, I., R. Moreau and P. Manjunath. 1999. Bovine seminal plasma phopholipid-binding proteins stimulate phospholipids efflux from epididymal sperm. Biol Reprod, 61: 590 - 598.
- Trimeche. A., J. M. Yvon, M. Vidament, E. Palmer, and M. Magistrini.1999. Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. Theriogenology, 52: 181 - 191.
- Van Wagtendonk-de Leeuw, A.M., R.M. Haring, L.M.T.E. Kaal-Lansbergen and J.H.G.Den Daas. 2000. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soybean extract. Theriogenology, 54: 57 - 67.
- Vera-Munoz, O.,L. Amirat-Briand,D. Bencharif,M. Anton,S. Desherces,E. Shmitt,C. Thorin and D.Tainturier. 2011. Effect of low-density lipoproteins, spermatozoa concentration and glycerol on functional and motility parameters of bull spermatozoa during storage at 4 degrees C. Asian Journal of Andrology, 13: 281 - 286.
- Verstegen, J., M.Iguer-Ouada and K.Onclin. 2002. Computer Assisted Semen Analyzers in Andrology Research and Veterinary Practice. Theriogenology, 57:149 - 179.
- Vishwanath. R., and P. Shannon. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. Anim Reprod Sci, 62: 23 - 53.

Watson, P.F., and I.C Martin. 1975. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5 degrees C. Aust J Biol Sci, 28:145 - 52.

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.

- Watson, P. F. 1981. The effects of cold shock on sperm cell membranes In ‘‘Effects of Low Temperatures on Biological Membranes’’ (G. J. Morris and A.Clarke, Ed.), Academic Press, London.
- White, I.G. 1993.Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: areview.Reorod Fertil Dev, 5:58 - 639.
Withers, L.A., and P.J. King. 1979. Proline: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of cultured cells of Zea mays. Plant Physiol, 64:8 - 675.

N° Ref: 545