

استخلاص وتجفيد البروتينات الدهنية واطئة الكثافة واستخدامها محل صفار البيض في مخففات Tris وتأثيرها في تشوهات النطف للكباش العواسي عند الحفظ بالتبريد 5°م

¹حوراء رسن بردي الصبيحاي ²حازم كسار جاسر الصعب ³محمد عبد الامير رشيد السراي

مدرس مساعد

مدرس

باحث

¹ و ² قسم الانتاج الحيواني-كلية الزراعة/ جامعة بغداد

³ قسم الانتاج الحيواني-كلية الزراعة/ جامعة واسط

Zainab_alhawra@yahoo.com

المستخلص

اجريت هذه الدراسة لغرض بيان امكانية تجفيد البروتينات الدهنية واطئة الكثافة (LDL) المستخلصة من صفار البيض واستخدامها بدل صفار البيض في مخفف السائل المنوي للكباش العواسي وتأثيرها على نسبة تشوهات النطف عند الحفظ بالتبريد لمدة خمسة ايام تم اجراء هذه الدراسة للمدة من تموز 2015 الى شباط 2016 وهي على ثلاث مراحل، المرحلة الاولى من تموز الى اب 2015 وفيها تم استخلاص (LDL) من خلال عدة خطوات متسلسلة من صفار البيض الطازج، المرحلة الثانية في اب 2015 في شركة الكندي وفيها تم تجفيد (LDL) السائل وتحويله الى مسحوق وتعبئته في علب معقمة ومحكمة وبعدها تم تخزينه بالتجميد بدرجة صفر م، اما المرحلة الثالثة فكانت في كلية الزراعة/ جامعة بغداد الجادرية من كانون الثاني وحتى شباط 2016 إذ تم جمع السائل المنوي من اربعة كباش عواسي باعمار تتراوح (2-4) سنة بواسطة المهبل الاصطناعي بعد ذلك قسمت العينة على معاملات التجربة بالتساوي 1مل/ معاملة باستخدام مخفف Tris وكانت نسبة التخفيف 1:10 وتم دراسة تأثير التراكيز المختلفة لل LDL على انواع التشوهات التي تحدث للنطف، وقد استخدم ثلاث تراكيز لل LDL (3.2 و 4.8 و 6.2%) للمعاملات T1 و T2 و T3 على التوالي ومعاملة السيطرة (20% صفار البيض)، تم دراسة تأثير LDL المجفف في انواع التشوهات التي تحصل للنطف عند الحفظ بالتبريد على درجة حرارة 5°م ولمدة خمسة ايام متتالية، وأشارت نتائج التجربة الى تفوق معاملات LDL في انخفاض نسبة التشوهات المختلفة التي تحصل للنطف في تشوهات الرأس المنتفخ على مجموعة السيطرة في اليومين الثالث والرابع وانعدمت التشوهات في الايام الاخرى كذلك تفوقت هذه المعاملات في تشوه الذيل المكسور في اليوم الرابع، وفي انواع اخرى من التشوهات لوحظ عدم وجود فرق معنوي بينها وبين مجموعة السيطرة كما في تشوهات الرأس المقطوع والذيل المقطوع والذيل الملطوي فضلاً عن انعدام التشوهات في انواع اخرى كما في تشوهات الذيل المزبوج والقطعة الوسطية المنتفخة، نستنتج مما تقدم امكانية استخدام LDL المجفف في مخففات السائل المنوي لما له من قابلية في حفظ انطف وتقليل بعض انواع التشوهات فضلاً عن انه لم يؤثر سلباً على النطف اذ انه كان مماثلاً لصفار البيض في حفظ النطف ان لم يكن افضل.

الكلمات المفتاحية: LDL مجفف، السائل المنوي للكباش، تبريد، تشوهات النطف.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences – 48(1): 342-349,2017

Al-Subaihawi & et al.

EXTRACTION AND LYOPHILIZATION LOW-DENSITY LIPOPROTEINS AND USED IT INSTEAD OF EGG YOLK IN SEMEN EXTENDER OF AWASSI RAMS AND THEIR INFLUENCE IN SPERM ABNORMALITIES STORE AT 5 ° C

H. R. B. Al-Subaihawi

H. K. J. Al-Saab

M. A. R. AL-SARRAY*

Recercher

Lecturer

Lecturer

1,2 Dep .of Animal Production - Coll. of Agric., Univ .of Baghdad

3 Dep .of Animal Production - Coll. of Agric., Univ .of Wasit

Zainab_alhawra@yahoo.com

ABSTRACT

This study was conducted to explain the possibility of lyophilization of low – density lipoprotein (LDL) that is extracted from the egg yolk to be used instead of the egg yolk in a dilute semen of Awassi sheep and its impact on the rate of deformities of sperm after stored at 5 ° C for five days. The study was conducted from September 2015 to February 2016 and in three stages. The first stage started from July until August 2015 in the laboratory of viruses, that is a related Department to the plant protection office. During this stage the (LDL) was extracted through several sequential steps from fresh egg yolk, and purified and stored in Fastened and sterilized vials which are refrigerated until the time of lyophilization. The second stage was conducted in August 2015 in Al-Kindy company. During this study the liquid (LDL) was lyophilized and kept in sterilized and tightly- fastened vials and then was stored in under the 0°C . The third stage was conducted in the college of Agriculture/ University of Baghdad. In this stage the semen was collected from four of the Awassi rams of the age (2 – 4) years .The semen samples were collected using artificial vagina and the pooled, to remove the individual differences between the rams. Later on the sample was divided on the experimental treatments evenly 1 ml/ transaction using a dilute Tris with 1:10 dilution ratio. The different concentrations of LDL on the characteristics of semen have also been studied. However; the experiment was conducted from January to February 2016 and during which three concentrations of LDL have been used (3.2 , 4.8 and 6.2%) the transactions T1, T2 , and respectively and the control treatment (20% EY). The improve of the lyophilized LDL has been studied on the different kinds of distortions that effect the sperm at preservation temperature 5°C, for five consecutive days. Results of the experiment to outweigh LDL transactions in the low proportion of the various distortions that happens to sperm in distortions head swollen to the control group in two days, third, fourth and zero, distortions on other days as well as these transactions excelled in deformation of the tail broken on the fourth day, and in other types of malformations observed failure the presence of significant difference between the control group as in the distortions severed head and tail severed tail twisted as well as the lack of distortions in other types as in distortions tail double moderation bulging and widget, we conclude from the foregoing the possibility of using LDL lyophilized in thinners semen because of its ability in maintaining semen and reduce some types of malformations as well as he did not adversely affect the sperm as it was similar to egg yolk in maintaining sperm if not better.

Key words: LDL lyophilized , Semen of rams , cryopreservation , sperm abnormalities.

المقدمة

عديدة وكون LDL لا يمكن حفظه بالتبريد أكثر من 4-5 أيام مما يحد من استخدامه بدل عن صفار البيض في مراكز التلقيح الاصطناعي فقد جاء هذا البحث لدراسة إمكانية تخفيف LDL وحفظه على شكل مسحوق في قناني معقمة وخزنيه لفترات طويلة واستخدامه في مخففات السائل المنوي لمعرفة تأثيره على بعض أنواع التشوهات التي تحدث للنطف اثناء التبريد مما ينتج في حالة نجاح هذه العملية فتح آفاق واسعة لاستخدامه في مراكز التلقيح الاصطناعي والاستعاضة عن صفار البيض الذي اضافته الى احتواءه على بعض المركبات المضرة بالنطف إذ ان الحصول على البيض الطازج يعتبر أحد المشاكل او الصعوبات في مجال تخفيف وتجميد السائل المنوي.

المواد وطرائق العمل

حيوانات التجربة: استخدم في هذه الدراسة 4 كباش عواسي تم تدريبها على جمع السائل المنوي بطريقة المهبل الاصطناعي Artificial Vagina وكانت اعمارهم تتراوح بين (2-4) سنوات ووزن جسم يتراوح (52-65) كغم وضعت هذه الحيوانات في قطيع واحد، وتم ايواها في حضائر من النوع نصف المغلق. في الحقل الحيواني التابع لكلية الزراعة في جامعة بغداد الجادرية، خضعت الحيوانات الى نظام غذائي موحد، يقدم العلف المركز يوميا بمعدل (300 غم/ حيوان)، وكانت مكونات العليقة التي يتم تحضيرها في الحقل هي 38% شعير و35% نخالة و10% كسبة فول صويا و15% ذرة و2% ملح، كلس، فيتامينات، مع تقديم العلف الاخضر والتبن يوميا، أما الماء الصالح للشرب وقوالب الاملاح المعدنية فكانت متوفرة أمام الحيوانات مع إضافة Amino - UVEVIT الى ماء الشرب.

تصميم التجربة: اجريت هذه الدراسة من تموز 2015 الى شباط 2016 وهي ثلاث مراحل وبواقع تجربتين: المرحلة الاولى من تموز الى اب 2015 في مختبر الفايروسات قسم التشخيص التابع لدائرة وقاية المزروعات الواقعة في قضاء ابي غريب شمال غربي بغداد لغرض اجراء استخلاص البروتينات الدهنية واطئة الكثافة (LDL) من البيض الطازج من خلال عدة خطوات وتمت تنقيته وتعبئته في علب محكمة ومعقمة وحفظه في التبريد لحين تجفيفه، اما المرحلة الثانية من التجربة فكانت في اب 2015 في شركة

ان حفظ السائل المنوي بالتبريد هي احد الوسائل المستخدمة في تقنيات التلقيح الاصطناعي بالتعاون مع برامج تحسين السلالات (11) ويشمل الحفظ بالتبريد خطوتين (التخفيف والتبريد) وتتعرض النطف خلال هذه المراحل الى صدمات البرودة وكذلك زيادة تفاعل واكسدة الدهون وتكوين البيروكسيد مما يؤدي الى تلف الغشاء (6) تعتبر النطف هي الاكثر حساسية لانخفاض السريع لدرجة الحرارة لكون التبريد تدريجيا (25-5) درجة مئوية (25 و27) وهذا يقلل من صدمة البرودة وان التبريد يسبب المرحلة الانتقالية للدهون في الغشاء البلازمي (16) كما انه يسبب فقدان النفاذية الانتقائية للغشاء البلازمي (18) واستنزاف الانزيمات من داخل الخلايا (10) والدهون (7 و19) واعادة توزيع الايونات (20) تغير في الغشاء البلازمي والجسيم الطرفي (الايروسوم) (14) والميتوكوندريا (26) وفقدان الحركة وانخفاض التمثيل الغذائي ومن العوامل التي تؤثر على النطف الطبيعية خلال الحفظ بالتبريد هي الضغط الازموزي والاجهاد وتركيب المخفف (مكوناته)، اما العوامل التي تؤثر على الحالة الوظيفية هي استقرار الغشاء والضرر التأكسدي وسلامة الغشاء البلازمي وسلامة النواة (24) خلال العقود الماضية اصبح صفار البيض احد اهم العناصر المستخدمة في مخفف السائل المنوي من إذ قابليته على الحد من صدمة البرودة التي تتعرض لها النطف في اثناء التخفيف والتبريد التجميد (4 و15) وقد وجد انه لصفار البيض على الرغم من فوائده الكثيرة له اضرارا على سلامة الغشاء البلازمي والايروسوم وكذلك على حركة النطف والسبب في ذلك يعود الى وجود بعض المواد الضارة في صفار البيض (1). وقد بينت الدراسات ان البروتينات الدهنية واطئة الكثافة LDL الموجودة في صفار البيض هي المسؤولة عن حماية الغشاء البلازمي للنطف وذلك من خلال المجموعة الفوسفاتية الموجودة في LDL التي تعمل على حماية النطف في اثناء الحفظ في التبريد (17)، إذ وجد (28) ان استخدام الـ LDL بنسبة 9% في مخفف السائل المنوي للكباش كان فعالاً في المحافظة على نسبة الكوليسترول/ الفوسفوليبيد في الأغشية البلازمية للنطف ومقاومة النطف لصدمة البرودة، لكون استخلاص LDL ليست سهلة وتحتاج الى وقت وخطوات

يشكل متساوي بالوزن وتعبئته في علب معقمة إذ احتوت كل علبه على 2.2 غم من LDL السائل وبعد التجفيد كان الوزن الناتج 0.52 غم إذ تم فقد رطوبة بمقدار 1.68 غم تقدر (67%) من وزن LDL (صورة 1).



صورة 1. المنتج النهائي علب LDL المجفد محكمة ومعقمة

اذابة البروتينات الدهنية واطئة الكثافة المجفدة LDL تم اذابة LDL المجفد في المخفف المحضر للسائل المنوي بعد وزنه وباستخدام جهاز الخلط المغناطيسي (Magnetic stirrer) ولمدة 5 دقائق حتى تذوب كل جزئيات LDL في المخفف وبعد ذلك يوضع في الحمام المائي على درجة حرارة 37 م ° ليكون نفس درجة حرارة السائل المنوي اثناء التخفيف.

نسبة النطف المشوّهة: حسب نسبة النطف المشوّهة بنفس الشريحة التي تم تقدير النطف الحية والميتة وحسب طريقة (9).

التحليل الاحصائي: استخدم البرنامج SAS (23) في التحليل الاحصائي على وفق التصميم العشوائي الكامل (CRD) لدراسة تأثير المعاملات لكل وقت والوقت لكل معاملة في الصفات المدروسة وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار Duncan (8) واستخدم الأنموذجين الرياضييين الاتيين:

الانموذج الرياضي الاول: للتحرّي عن تأثير المعاملة لكل وقت:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

إذ ان:

Y_{ij} : قيمة المشاهدة j العائدة للمعاملة.

μ : المتوسط العام للصفة.

الكندي للقاحات والموصول الواقعة في قضاء ابي غريب إذ تم تعبئة البروتينات واطئة الكثافة السائلة (LDL) في علب Vials معقمة وتجميده في جهاز التجفيد (التجفيد بالتجميد) Freeze drying وهي عملية سحب الرطوبة من المادة وتحويلها الى مادة جافة بشكل مسحوق وكانت نسبة الرطوبة المفقودة من LDL السائل (67%) وذلك من خلال وزن LDL السائل ووزنه بعد التجفيد وكان الفرق بين الوزنين هو وزن الرطوبة المفقودة، اما المرحلة الثالثة للدراسة فقد اجريت في الحقل الحيواني التابع لكلية الزراعة/ جامعة بغداد/ الجادرية بواقع تجربة (كانون الثاني - شباط) إذ تم جمع السائل المنوي من اربعة كباش عواسي بواقع قذفة واحدة/ كبش/ اسبوع وقد بلغ عدد القذفات خلال مدة التجربة (28) قذفة على طول التجربة تم تجميع السائل المنوي ومزجه مع بعض (Pooled semen) وذلك بهدف ازالة الفروق الفردية بين الكباش ومن ثم تقسيم السائل المنوي باستخدام مخفف Tris الذي تم اعداده سابقا حسب طريقة (22) واستخدم ثلاث تراكيز من LDL المجفد (3.2 و 4.8 و 6.4% للمعاملات T1 و T2 و T3 على التوالي) ومجموعة السيطرة 20% صفار البيض.

طريقة استخلاص LDL

تم استخلاص البروتينات الدهنية واطئة الكثافة من صفار البيض الطازج حسب طريقة (17) وفق سلسلة من الخطوات لحين تثقيته وتعبئته في علب محكمة الغلق ومعقمة لحين تجفيفه بالتجميد.

طريقة تجفيد البروتينات الدهنية واطئة الكثافة

التجفيد Lyophilisation (التجميد الجاف) Dry freeze هو عبارة عن عملية سحب الرطوبة من المواد سريعة التلف وتحويلها من الحالة السائلة الى الحالة الصلبة خالية من الرطوبة لزيادة العمر الخزنّي لها من خلال تجميد المواد السائلة ثم تقليل الضغط المحيط بها للسماح بتسامي المياه الموجودة في المادة بشكل مباشر، اجريت عملية التجفيد في شركة الكندي لانتاج اللقاحات والموصول الواقعة في ابي غريب إذ انه بعد تجميع LDL المستخلص من صفار البيض وهو بالحالة السائلة ليتم تحويله الى الحالة الصلبة بشكل مسحوق ليتم حفظه بشكل اسهل ولمدة اطول وتمت عملية التجفيد كما اشار اليها (13) تم تقسيم LDL السائل

T_i : تأثير المعاملة المدروسة.

e_{ij} = الخطأ العشوائي الذي يتوزع طبيعياً بمتوسط يساوي صفراً وتباين قدره σ^2 .

النموذج الرياضي الثاني: للتحري عن تأثير الوقت لكل معاملة:

$$Y_{ij} = \mu + P_i + e_{ij}$$

إذ إن:

P_i : تأثير الوقت (أيام الحفظ).

أما باقي الرموز فهي كما وردت في النموذج الرياضي الأول المذكور آنفاً.

النتائج والمناقشة

النسبة المئوية الكلية للنظف المشوهة: أظهرت النتائج عدم وجود فرق معنوي بين معاملات LDL ومعاملة السيطرة طيلة مدة الحفظ بالتبريد في نسبة النظف المشوهة، وللمقارنة بين أيام الحفظ بالتبريد فقد لوحظ عدم وجود فرق معنوي للمعاملتين الأولى والثانية بين الأيام جدول (1)، أما في المعاملة الثالثة فقد وجد أقل نسبة تشوه للنظف معنوياً في اليوم الأول والثالث والرابع مع عدم وجود فرق معنوي بينها، في حين ارتفعت نسبة التشوه في اليوم الثاني للتبريد إذ بلغت 10.14 ± 2.12 إلى أن وصل أعلى نسبة تشوه في اليوم الخامس $13.16 \pm 1.49\%$ مع عدم وجود فرق معنوي بين اليومين الثاني والخامس. وفي مجموعة السيطرة فقد كان أقل نسبة تشوه في اليوم الأول للحفظ بالتبريد حيث بلغت نسبة النظف المشوهة $1.97 \pm 7.87\%$ مع عدم وجود فرق معنوي بين الأيام الأربعة الأولى للحفظ بالتبريد رغم ارتفاع نسبة التشوه في الأيام الثاني والثالث والرابع، في حين أعلى نسبة تشوه في اليوم الخامس حيث بلغت نسبة النظف المشوهة $14.83 \pm 1.44\%$ لليوم الخامس ولم يلاحظ فرق معنوي بين الأيام الثاني والرابع والخامس (جدول 1،

النسبة المئوية للنظف ذات الراس المقطوع: أظهرت نتائج التحليل الإحصائي عدم وجود فروق معنوية بين معاملات السيطرة طيلة أيام مدة الحفظ (خمسة أيام)، وللمقارنة بين مدة الحفظ لم يلاحظ فرق معنوي بين الأيام في المعاملة الأولى في حين في المعاملة الثانية لوحظ عدم وجود فرق معنوي في الأيام الأربعة الأولى في حين زادت في اليوم

الخامس إذ بلغت أعلى نسبة للنظف مقطوعة الراس في اليوم المذكور $3.50 \pm 2.50\%$ ولم يلاحظ فرق معنوي بين الأيام في المعاملة الثالثة كذلك مجموعة السيطرة حيث كان نسبة النظف منخفضة طول مدة الحفظ (الجدول 2).

النسبة المئوية للنظف ذات الرأس المنتفخ: أوضحت النتائج في دراستنا الجدول انعدام تشوه تضخم أو انتفاخ رأس النطفة في معاملات LDL طيلة أيام الحفظ بالتبريد لمدة خمسة أيام إذ تفوقت المعاملات T1 و T2 و T3 على مجموعة السيطرة في هذه الصفة إذ ارتفعت نسبة النظف ذات الرأس المنتفخ في معاملة السيطرة في اليومين الثالث والرابع إذ بلغت 0.40 ± 0.24 و $0.60 \pm 0.24\%$ لليومين المذكورين على التوالي، مع ملاحظة عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات ومجموعة السيطرة طيلة الأيام باستثناء اليوم الثالث للحفظ حيث تفوقت المعاملات على مجموعة السيطرة، ولم يلاحظ فرق معنوي بين الأيام في معاملات LDL باستثناء معاملة السيطرة الذي لوحظ انخفاض معنوي في اليوم الثالث للحفظ بالتبريد مقارنة بالأيام الأخرى.

النسبة المئوية للنظف ذات الذيل المقطوع: بين من التحليل الإحصائي للنظف المشوهة ذات الراس الذيل المقطوع عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات طيلة أيام الحفظ، وفي نفس السياق للمقارنة بين الأيام لوحظ عدم وجود فرق معنوي بين الأيام الأربعة الأولى في المعاملة الأولى في حين لوحظ ارتفاع نسبة التشوه في اليوم الخامس للحفظ مقارنة بأيام الحفظ الأخرى إذ بلغت $6.50 \pm 3.50\%$ ، ولم يلاحظ فرق معنوي بين الأيام في المعاملات الأخرى (T2 و T3 والسيطرة) الجدول (3).

النسبة المئوية للنظف ذات الذيل الملتف: لوحظ من التحليل الإحصائي للذيل الملتوي انخفاض نسبة التشوه طيلة مدة التجربة ولم يلاحظ فرق معنوي بين معاملات LDL ومجموعة السيطرة طيلة مدة الحفظ (خمسة أيام) (الجدول 4) كما أوضحت النتائج عدم وجود فرق معنوي بين الأيام فقد لوحظ انخفاض نسبة التشوهات طيلة مدة الحفظ (الجدول 4).
النسبة المئوية للنظف ذات الذيل المكسور: بينت نتائج التحليل الإحصائي للنظف المشوهة تفوق المعاملتين الأولى والثانية على مجموعة السيطرة في انخفاض نسبة تشوه الذيل المكسور في اليوم الرابع للحفظ بالتبريد إذ بلغت $0.80 \pm$

والحليب) على التوالي، في حين لوحظ ارتفاع نسبة النطف المشوهة في الايام الاخيرة للحفاظ بسبب التعرض لصدمة البرودة وهذا ايضا يتفق مع الباحث المذكور اذ لاحظ في دراسته ارتفاع نسبة النطف المشوهة اذ بلغت 15.37 \pm 4.43 و 10.54 \pm 2.98 و 10.08 \pm 3.64 و 10.87 \pm 4.61 و 14.66 \pm 2.51% ولمدة (قبل التبريد، بعد التبريد، بعد 24 ساعة، بعد 48 ساعة، بعد 72 ساعة) على التوالي، اختلفت نتيجتنا مع ما حصل عليه العاني (2) في دراسته حيث لاحظ تفوق معاملات LDL الطازج في انخفاض نسبة النطف المشوهة مقارنة مع مجموعة السيطرة في التبريد والتجميد، وقد بينت النتائج انعدام الفروق المعنوية بين المعاملات ومجموعة التجربة في النسبة المئوية لتشوهات النطف ذات الرأس المقطوع والذيل المقطوع والملتوي إذ لوحظ انخفاض نسبة التشوهات طيلة ايام التجربة وهذا ما يدل على قابلية LDL على حفظ النطف والمحافظة على الغشاء البلازمي من صدمة البرودة مماثل لقدرة صفار البيض على حفظ النطف وقد يعود انعدام الفروق المعنوية بين المعاملات والسيطرة الى قلة التراكيز المستخدمة من LDL، وفي نفس السياق لتشوهات الرأس كانت معاملات LDL متفوقة على مجموعة السيطرة في نسبة تشوه الرأس المنتفخ طيلة ايام الحفظ بالتبريد وهذا ما يدل على قابلية LDL على حفظ اغشية النطف طيلة مدة الحفظ وحمايتها من صدمة البرودة، انسجاما مع نتائج التشوهات فقد لوحظ تفوق معاملات LDL على مجموعة السيطرة في تشوهات الذيل المكسور وهذا ما يدل على قابلية LDL في حماية النطف وقد يعود الى اندماج LDL مع اغشية النطف اثناء عملية التبريد مما ادى الى زيادة مقاومتها لصدمة البرودة (5)، وفي نفس السياق فقد لوحظ انعدام تشوهات القطعة الوسطية في معاملات LDL وكذلك السيطرة باستثناء اليوم الخامس للمعاملة الثالثة الذي وجد فيها تشوه القطعة الوسطية للمعاملة المذكورة قد يكون بسبب مدة الحفظ التي تؤثر سلباً في نسبة النطف الطبيعية، ان تفوق معاملات LDL على مجموعة السيطرة في بعض الصفات قد يعود الى نقاوة البروتينات الدهنية واطئة الكثافة التي تعمل على المحافظة على النطف، فضلاً عن خلوها من الحبيبات الضارة التي تؤدي الى تثبيط عملية تنفس النطف وايقاف الايض الغذائي الذي تسببه البروتينات الدهنية عالية

0.48 و 0.80 ± 0.48 % للمعاملتين المذكورتين انفاً ولم يلاحظ فرق معنوي بين هاتين المعاملتين والمعاملة الثالثة اذ بلغت 1.60 ± 0.24 % للمعاملة الثالثة في حين كان اعلى نسبة للنطف ذات الذيل المكسور في مجموعة السيطرة اذ بلغت 2.60 ± 0.50 %، ولم يلاحظ فرق معنوي بين المعاملات ومجموعة السيطرة في الايام الاولى والثاني والثالث والخامس حيث لوحظ انخفاض نسبة التشوه في المعاملات للأيام المذكورة (الجدول 5)، كما اوضحت النتائج عدم وجود فرق معنوي بين ايام الحفظ الخمسة لكافة المعاملات (الجدول 5).

النسبة المئوية للنطف ذات الذيل المزوج: اظهرت نتائج التحليل الاحصائي لتشوهات النطف انعدام تشوه الذيل المزوج في كافة المعاملات والايام مقارنة مع مجموعة السيطرة باستثناء اليوم الرابع في المعاملة الثانية T2 حيث وجد نسبة تشوه بلغت 0.40 ± 0.40 % مع انعدام الفروق المعنوية بين المعاملات والايام طيلة مدة الحفظ بالتبريد (خمسة ايام).

النسبة المئوية لتشوهات القطعة الوسطية للنطف (انتفاخ القطعة الوسطية): بينت نتائج التحليل الاحصائي انعدام تشوهات القطعة الوسطية طيلة ايام الحفظ ما عدا اليوم الخامس في المعاملة الثالثة لوحظ وجود انتفاخ في القطعة الوسطية وبلغت نسبتها 1.50 ± 1.50 %، كما اظهرت النتائج عدم وجود فرق معنوي بين الايام طيلة مدة الحفظ (خمسة ايام) باستثناء اليوم الخامس للمعاملة الثالثة الذي وجد فيه التشوه بالنسبة المذكورة انفاً.

اكدت نتائج الدراسة الحالية الى ان دور البروتينات الدهنية واطئة الكثافة المجفدة في المحافظة على النطف مشابه لدور صفار البيض اذا لم يكن افضل من خلال انخفاض نسبة التشوهات الكلية في جميع معاملات التجربة عند التبريد 5°م إذ لوحظ في نسبة تشوهات الكلية للنطف (الجدول 1) عدم وجود فرق معنوي بين معاملات LDL ومجموعة السيطرة طيلة ايام مدة الحفظ وهذا يتفق مع ما جاء به (3) اذ لم يلاحظ وجود فرق معنوي بين نوع المخفف المستخدم عند استخدامه ثلاث انواع من المخففات اذ بلغت نسبة النطف المشوهة في دراسته 11.40 ± 3.80 و 12.40 ± 4.50 و 13.82 ± 3.34 % للمخففات (Tris وسترات الصوديوم

لفترات طويلة يمكن استخدامه وقت الحاجة، وتعتبر الدراسة الحالية هي الاولى من نوعها في العراق والعالم في دراسة تأثير LDL في نسبة التشوهات بشكل تفصيلي وقد اعطت نتائج ايجابية ومميزة في الصفات المدروسة وبذلك يمكن استنتاج انه بالإمكان استخدام LDL المجفد في مخففات السائل المنوي.

الكثافة الموجودة في صفار البيض (21)، لذا يمكننا القول انه ممكن استخدام LDL المجفد في مخففات السائل المنوي وذلك لقابليته في حفظ النطف المماثلة لصفار البيض او افضل قد يكون بكفاءة LDL الطازج والذي اثبتت عدة دراسات كفاءته في حفظ النطف (12) والذي اثبت قابلية حفظه للنطف من صدمة البرودة، فضلاً عن قابلية حفظه

جدول 1. تأثير المعاملة والوقت على نسبة المئوية الكلية للنطف المشوهة للكباش العواسي بعد اضافة نسب مختلفة من

LDL الى مخفف Tris (المتوسط ± الخطأ القياسي)

المعاملة	الايام				
	5	4	3	2	1
T1	A a 2.37 ±14.33	A a 2.28 ±12.37	A a 8.67 ±19.62	A a 1.10 ±9.50	A a 1.21 ±7.87
T2	A a 0.95 ±11.33	A a 1.46 ±8.75	A a 1.32 ±9.87	A a 9.18 ±15.87	A a 2.08 ±7.37
T3	A a 1.49 ±13.16	A abc 0.86 ±9.75	A bc 0.94 ±7.88	A ab 2.12 ±10.14	A c 1.02 ±5.87
السيطرة	A a 1.44 ±14.83	A ab 1.48 ±11.75	A b 1.20 ±9.25	A ab 2.26 ±10.25	A b 1.97 ±7.87

المتوسطات التي تحمل حروف كبيرة ضمن العمود الواحد (بين المعاملات) وحروف صغيرة ضمن الصف الواحد (بين الايام) تختلف معنويًا فيما بينها. T1: 3.2% LDL مجفد / T2: 4.8% LDL مجفد / T3: 6.4% LDL مجفد / السيطرة 20% صفار البيض.

جدول 2. تأثير المعاملة والوقت في نسبة تشوه الراس المقطوع لنطف الكباش العواسي بعد اضافة نسب مختلفة من LDL

الى مخفف Tris (المتوسط ± الخطأ القياسي)

المعاملة	الايام				
	5	4	3	2	1
T1	Aa1.0 ± 1.00	Aa0.37 ± 0.80	Aa0.42 ± 0.40	Aa0.52 ± 1.28	Aa0.53 ± 1.0
T2	Aa2.50 ± 3.50	Ab0.24 ± 0.60	Ab0.22 ± 0.50	Ab0.29 ± 0.42	Ab0.42 ± 0.71
T3	Aa0.00 ± 0.00	Aa0.58 ± 0.80	Aa0.37 ± 0.80	Aa0.50 ± 1.14	Aa0.45 ± 0.85
سيطرة	Aa1.50 ± 1.50	Aa0.60 ± 0.40	Aa0.40 ± 0.40	Aa0.20 ± 0.57	Aa0.18 ± 0.28

المتوسطات التي تحمل حروف كبيرة ضمن العمود الواحد (بين المعاملات) وحروف صغيرة ضمن الصف الواحد (بين الايام) تختلف معنويًا فيما بينها. T1: 3.2% LDL مجفد / T2: 4.8% LDL مجفد / T3: 6.4% LDL مجفد / السيطرة 20% صفار البيض.

جدول 3. تأثير المعاملة والوقت في نسبة تشوه الذيل المقطوع لنطف الكباش العواسي بعد اضافة نسب مختلفة من LDL الى

مخفف Tris (المتوسط ± الخطأ القياسي)

المعاملة	الايام				
	5	4	3	2	1
T1	Aa3.50 ± 6.50	Aab0.80 ± 3.20	Aab1.74 ± 3.80	Aab1.16 ± 4.14	Ab0.47 ± 1.28
T2	Aa0.50 ± 2.50	Aa1.78 ± 3.00	Aa2.05 ± 4.20	Aa1.04 ± 2.71	Aa 1.10 ± 1.42
T3	Aa0.00 ± 7.00	Aa1.85 ± 3.80	Aa1.93 ± 3.40	Aa1.82 ± 3.42	Aa1.41 ± 1.57
سيطرة	Aa0.50 ± 2.50	Aa1.91 ± 4.60	Aa1.28 ± 4.20	Aa2.31 ± 5.57	Aa1.53 ± 2.14

المتوسطات التي تحمل حروف كبيرة ضمن العمود الواحد (بين المعاملات) وحروف صغيرة ضمن الصف الواحد (بين الايام) تختلف معنويًا فيما بينها. T1: 3.2% LDL مجفد / T2: 4.8% LDL مجفد / T3: 6.4% LDL مجفد / السيطرة 20% صفار البيض.

جدول 4. تأثير المعاملة والوقت في نسبة تشوه الذيل الملثوي لنطف الكباش العواسي بعد اضافة نسب مختلفة من LDL الى

مخفف Tris (المتوسط ± الخطأ القياسي)

المعاملة	الايام				
	5	4	3	2	1
T1	Aa1.00 ± 2.00	Aa1.61 ± 5.00	Aa1.20 ± 4.40	Aa 1.10 ± 4.85	Aa 1.21 ± 4.00
T2	Aa0.00 ± 1.00	Aa0.92 ± 2.60	Aa1.07 ± 3.60	Aa1.86 ± 4.14	Aa0.91 ± 2.10
T3	Aa0.00 ± 0.00	Aa1.31 ± 3.80	Aa0.97 ± 3.40	Aa0.89 ± 4.42	Aa0.98 ± 3.10
سيطرة	Aa 0.00 ± 2.00	Aa0.73 ± 3.80	Aa1.28 ± 3.60	Aa0.53 ± 3.28	Aa2.74 ± 6.00

المتوسطات التي تحمل حروف كبيرة ضمن العمود الواحد (بين المعاملات) وحروف صغيرة ضمن الصف الواحد (بين الايام) تختلف معنويًا فيما بينها. T1: 3.2% LDL مجفد / T2: 4.8% LDL مجفد / T3: 6.4% LDL مجفد / السيطرة 20% صفار البيض.

جدول 5. تأثير المعاملة والوقت في نسبة تشوه الذيل المكسور لنطف الكباش العواسي بعد إضافة نسب مختلفة من LDL الى مخفف Tris (المتوسط \pm الخطأ القياسي)

الايام					المعاملة
5	4	3	2	1	
Aa 0.50 ± 1.50	Ba 0.48 ± 0.80	Aa 1.02 ± 2.40	Aa 0.36 ± 1.42	Aa 0.34 ± 1.14	T1
Aa 0.00 ± 1.00	Ba 0.48 ± 0.80	Aa 0.48 ± 1.80	Aa 0.47 ± 1.71	Aa 0.42 ± 1.71	T2
Aa 0.00 ± 0.00	ABa 0.24 ± 1.60	Aa 0.50 ± 1.60	Aa 1.02 ± 3.00	Aa 0.73 ± 1.85	T3
Aa 0.50 ± 1.50	Aq 0.50 ± 2.60	Aa 0.66 ± 1.80	Aa 0.63 ± 1.85	Aa 0.61 ± 2.00	سيطرة

المتوسطات التي تحمل حروف كبيرة ضمن العمود الواحد (بين المعاملات) وحروف صغيرة ضمن الصف الواحد (بين الايام) تختلف معنويًا فيما بينها. T1: LDL %3.2 مجفد / T2: LDL %4.8 مجفد / T3: LDL %6.4 مجفد / السيطرة 20% صفار البيض.

REFERENCES

1. Aboagla, E.M.E., Terada, T. 2004. Effects of the supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62: 809-818.
2. Al-Ani, A.B.A. Al-Ani, A.B.A. 2015. Extraction of low density lipoproteins and its using in the Tris extender of frozen Holstein bulls semen in Iraq . M.Sc. Thesis. Department .of Animal Production - College. of Agriculture., University .of Baghdad.
3. Albiaty, Nameer M.H.; Alobaidi , Hazem J.K.; Kareem, Abbas F.; Al-Hakim, Ali M.; Alnaeb, Anmar Y.; Alkhazraji, A. A. H. 2015. Effect of extenders and preservation periods in some semen characteristics of awassi rams. *World Journal of Pharmaceutical Research* , V (5), 2; 234-243.
4. Amirat, L.; T. Daniel; J. Laetitia; T. Chantal; G.Olivier; L. C.Jean .and A .Marc. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl1, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 61 :895- 907.
5. Briand-Amirat, L. Bencharif , D.; Moreno, D .; Neira, A.; Destrumelle, S.; Tain-turier, D.; 2013. Preliminary results : the advantages of low - density lipoproteins for the cryopreservation of equine semen. *Equine Vet.Sci.* 33, 1068-1075.
6. Bucak, M. N.; Ates A.; Ahin S. and Yuce A. 2008. Effect of antioxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research*, 75(2-3) : 128-134.
7. Darin-Bennett A.; Poulos A.; White I.G. 1973. The effect of cold shock and freeze-thawing on release of phospholipids by ram, bull, and boar spermatozoa. *Aust J Biol Sci*; 26:1409-20.
8. Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11:1-42.
9. Hancock, J. L. 1951. Asaining technique for the study of temperature shock in semen. *Nature*, 167: 323-324.
10. Harrison, R. and White I. G. 1972. Glycolytic enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets of bull, boar and ram, and their leakage after shock. *J Reprod. Fertil.*, 30:105-115.
11. Holt, W.V. and North, R.D. 1994. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biol Reprod*; 51: 414-24.
12. Hu, Jian-hong; Qing-Wang Li; Gang-Li; Xiao-Yu Chen; Hai-Yang; Shu-Shan Zhang; and Li-Qiang Wang. Asian-Aust. 2006. The Cryoprotective Effect on Frozen-thawed Boar Semen of Egg Yolk Low Density Lipoproteins. *J. Anim. Sci.*, 19(4) : 486-49.
13. Jennings T. A. 1997. Effect of formulation on lyophilization. *Asian journal of pharmaceutical science*, 54-63.
14. Jones RC and Martin ICA 1973. The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5 8C in the ultrastructure of ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 35: 311-320.
15. Manjunath P. 2012 . New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Anim. Reprod.* ,809-815.
16. Morris, G.J. and Clark, A .1987. The effects of low temperatures on biological systems. London: Edward Arnold. Pg 72-119.
17. Moussa, M.; Martinet, V.; Trimeche, A.; Tainturier, D.; and Anton, M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 57: 1695-1706.

18. Ortman, K.; Rodriguez, A. and Martin, H. 1994. Membrane damage during dilution, cooling and freezingthawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags. *Veterinary Medicine A-Zbl Vet A -Physiolog*, 41: 37-47.
19. Pickett, B. W.; Komarek, R. J. 1964. Evidence for loss of lipid from bovine spermatozoa due to freezing. *J Dairy Sci*;47:905-7.
20. Quinn PJ and White IG 1968. The effect of pH, cations and protective agents on the susceptibility of ram spermatozoa to cold shock. *Experimental Cell Research*, 49: 31-39.
21. Robertson, L.; Bailey JL. and Buhr MM. .1990. Effects of cold shock and phospholipase A2 on intact boar spermatozoa and sperm head plasma membranes *Mol. Reprod., Dev.*26:143-149.
22. Salamon, S. and Maxwell ,W.M. 2000. Storage of ram semen. *AnimReprodSci*, 62:77-111.
23. SAS . 2012 . SAS \STAT User ,s Guide for personal Computers .Release 9.1 SAS Institute Inc ,Cary .N.C.,USA .
24. Watson, P.F. 2000. The causes of reduce fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod.Sci.*,60(1):481-492.
25. Watson, PF. 1981. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris GJ, Clark A (eds), *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. Academic Press London, : 189-218.
26. Watson, PF. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*,7:871-891.
27. White, IG. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod. Fertil. Dev.*,5:639-658.
28. Yun-sheng, Z.; Wei H.; Li-ping N.; Dong-hai T.; Yong-yue L.; Chang-sheng D. and Jin-quan L. . 2008. Effects of Egg Yolk and LDL on Changes of Cholesterol and Phospholipids in Sheep Spermatozoa during Freezing ..*ActaAgricultura*, 23 (6) : 112-115.