استخلاص وتجفيد البروتينات الدهنية واطئة الكثافة واستخدامها محل صفار البيض في مخففات Tris وتأثيرها على بعض صفات النطف للكباش العواسي عند الحفظ بالتبريد على درجة حرارة 5م°

حوراء رسن بردي الصبيحاوي * حازم كسار جاسر الصعب

باحث مدرس

قسم الثروة الحيوانية– كلية الزراعة/ جامعة بغداد

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 للأغنام العواسي وتأثيرها على صفات السائل المنوي عند الحفظ بالتبريد لمدة خمسة أيام فضلاً عن الحصول على بروتينات دهنية واطئة الكثافة معقمة ومجفدة (مسحوق) يمكن خزنها لفترات طويلة واستخدامها عند الحاجة ، اجريت 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 صفار البيض الطازج، المرحلة الثانية في اب 2015 وفيها تم تجفيد (LDL) السائل وتحويله الى مسحوق وتعبئته في علب معقمة وبعدها تم خزنه بالتجميد بدرجة صفر م، المرحلة الثالثة في كلية الزراعة/جامعة بغداد من كانون الثاني وحتى شباط تم جمع السائل المنوي من اربعة كباش عواسي باعمار تتراوح (2 –4) سنة تم فيها جمع عينات السائل المنوي بواسطة المهبل الاصطناعي، وقسمت العينة على معاملات التجربة بالتساوي 1مل/معاملة باستخدام مخفف Tris وكانت نسبة التخفيف 1:10 وتم دراسة تأثير التراكيز المختلفة لـ LDL على صفات السائل المنوي. وقد استخدم ثلاث تراكيز LDL (3.2 و4.8 و6.2 %) للمعاملات T1 وT2 وT3 على التوالي والسيطرة (20% صفار البيض)، تم دراسة تأثير LDL المجفد على بعض خصائص النطف عند الحفظ بالتبريد على درجة حرارة 5° م ولمدة خمسة أيام متتالية، اشارت نتائج التجربة الى تفاوت الفروق بين المعاملات في خصائص النطف إذ تفوقت المعاملة T3 معنويا (P<0.05)في الحركة الفردية في اليومين الثاني والثالث ولم نلاحظ فرق معنوي في الايام الاخرى للتبريد في حين لم يلاحظ فرق معنوي في النسبة المئوية للنطف الحية بين المعاملات والسيطرة وقد كانت قابلية حفظ LDL للنطف اعلى مما هو عليه في معاملة السيطرة للغشاء البلازمي اذ تفوقت المعاملة T2 وT3 معنويا (P<0.05) على معاملة السيطرة في الأيام الثالث والرابع والخامس للحفظ كذلك كان التفوق للمعاملات نفسها في قابلية حفظها للأكروسوم في أيام مختلفة من الحفظ مقارنة مع معاملة السيطرة اذ تفوقت المعاملة T2 في اليومين الاول والثاني ولم نلاحظ فرق معنوي في اليوم الثالث والرابع بين المعاملات والسيطرة وتفوقت المعاملتين T2 وT3 معنويا (P<0.05) في اليوم الخامس من الحفظ على مجموعة السيطرة، نستنتج مما تقدم انه بالامكان تجفيد LDL وحفظه بالتجميد واستخدامه وقت الحاجة كما يمكن استخدام LDL المجفد في مخففات السائل المنوي لما له من تاثير ايجابي في حفظ النطف وقد لوحظ ان افضل تركيز في المحافظة على خصائص النطف هو LDL%6.4 مقارنة مع صفار البيض والمعاملات الاخرى.

كلمات مفتاحية: LDL مجفد، تبريد السائل المنوي،

*البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول

EXTRACTIUON AND LYOPHILIZATION OF THE LOW DENSITY OF LIPOPROTEIN INSTEAD OF EGG YOLK ON SOME SEMEN PARAMETERS OF AWASSI RAMS

H. R. B. Al-Subaihawi H. K. J. Al-Saab*

Researcher Lecturer

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

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 an extender semen that belong to the Awassi sheep and their effect on the characteristics of the semen after five days of cryopreservation, as well as to get low-density Lipoprotein, steriled and lyophilized (powder) lipoprotein that can be stored for a long time to used when needed. The study was conducted in the from July 2015 to February 2016. The first stage started from July until August 2015 the (LDL) was extracted from fresh egg. The second stage in August 2015. the liquid (LDL) has been lyophilized and turn into powder that is packed in vials, steriled vials and then was stored in 0°C. The third stage was conducted from January to February 2016 in the college of Agriculture/ University of Baghdad. the semen was collected from four of the Awassi rams of the age (2– 4) years and the samples was collected by using artificial vagina. After that the sample was divided on the experimental treatments evenly 1ml/ transaction by using extender Tris. The dilution ratio was 1: 10. The effect of the different concentrations had been studied of the LDL on the characteristic of semen and three concentration of the LDL were used (3.2, 4.8 and 6.2%) for the transactions T1, T2,T3 respectively and the control treatment (20% EY).The effect of the lyophilized LDL was studied on some characteristic of sperm when cryopreserved under the temperature 5°c for five days. The Results of the experiment to varying differences between transactions in sperm characteristics as treatment outperformed T3 (P <0.05) in the individual movement in the 2nd and 3rd days and did not notice a significant difference on the other days, while a significant difference in the percentage of live sperm among the treatments and control were observed viability of keeping LDL of sperm higher was than it is in the control treatment of the plasma membrane as treatment outperformed T2 and T3 (P <0.05) on the treatment of control on the 3rd, 4th and 5th of conservation was also excel themselves transactions in susceptibility saved for acrosome on different days of conservation compared with the control treatment as it overtook treatment T2 in the first two days and did not notice a significant difference on the 3rd and 4th among the treatments and control excelled treatments T2 and T3 (P <0.05) in 5th day of conservation to the control, we conclude from the foregoing that it is possible freeze-drying LDL and save the freeze and use it in time of need can also be used in lyophilized LDL thinners semen because of its positive impact in keeping sperm has been observed that the best concentration of sperm in maintaining the properties is 6.4% LDL compared with egg yolk and other transactions.

Key words: LDL lyophilized, cryopreservation semen .

***Part of M.Sc. thesis of the first author.**

المقدمة

ان مشكلة انخفاض اعداد الاغنام العواسي احدى اكبر مشاكل الثروة الحيوانية العراق وذلك نتيجة الطلب المتزايد على منتجاتها المرغوبة، لذلك استعملت تقنية التلقيح الاصطناعي للحفاظ عليها وزيادة اعدادها وانخفاض خصوبتها من جهة اخرى، فضلا عن ذلك لم تكن تقنيات حفظ السائل المنوي بالتبريد او التجميد بالمستوى المطلوب، وذلك لعدم اكتمال المعلومات وبرامج التحسين الوراثي نتيجة لتواضع المختبرات المحلية (**2**)، بدأت الدراسات حول التلقيح الاصطناعي في الاغنام في بداية القرن العشرين (17 و18) إذ في بداية 1930 تم استخدام السائل المنوي الطازج (Fresh) والمخفف على نطاق واسع في تربية الاغنام وان الحاجة الى اخصاب عدد كبير من النعاج من السائل المنوي للكباش ذات الصفات الجدية والمرغوبة ادى الى زيادة مراكز التلقيح وقد لوحظ ضرورة استخدام السائل المنوي لفترات طويلة وفي اوقات معينة من السنة مما ادى الى التركيز حول البحث لحفظ السائل المنوي بطرق صناعية تحت ظروف معينة ويمكن تحقيق ذلك عن طريق تقليل التمثيل الغذائي للنطف وبالتالي اطالة فترة الحفظ وبذلك فقد لوحظ استخدام درجة حرارة منخفضة (التبريد) ادى الى انخفاض التمثيل الغذائي للنطف وبالتالي يمكن خزنها بدرجة حرارة 5°م وهذه الطريقة الاولى (24). اما الطريقة الاخرى تكون بخفض درجة الحرارة دون الصفر المئوي (بالتجميد) وبذلك يمكن استخدامها في أي وقت (34)، وخلال العقود الماضية اصبح صفار البيض احد اهم العناصر المستخدمة في مخفف السائل المنوي لقابليته على الحد من صدمة البرودة التي تتعرض لها النطف في اثناء التخفيف والتبريد التجميد (5 و22) وقد وجد انه لصفار البيض على الرغم من فوائده الكثيرة له اضراراً على سلامة الغشاء البلازمي والأكروسوم 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 (26) وبعد النجاح في استخلاص الـ LDL من صفار البيض وبطريقة عملية من (26) وحصوله على نتائج تفوق فيها الـ LDL على صفار البيض الكامل في مخففات حفظ نطف الثيران بالتجميد، فقد استخدم الـ LDL من عدة باحثين، إذ وجد (41) ان استخدام الـ LDL بنسبة 9% في مخفف السائل المنوي للكباش كان فعالاً في المحافظة على نسبة الكولسترول/ الفوسفولبيد في الأغشية البلازمية للنطف ومقاومة النطف لصدمة البرودة، وان اضافة LDL المستخلص من صفار البيض الى مخففات السائل المنوي للأغنام بتراكيز 8،5 و20% كان لها الاثر الواضح في حفظ النطف وقد تم اختيار تركيز 20% وتركيز 8% وتبين لها نفس القدرة على حماية النطف من صدمة البرودة (4 و27 و38) وهناك محاولات محدودة في مجال تجفيد LDL واستخدامه في مخففات السائل المنوي (27و29) الذين حصلوا على نتائج سلبية لاستخدام LDL مجفد في اغلب خصائص النطف، فضلاً عن (6) الذي استخدم LDL مجفد وبتراكيز منخفضة وقد وجد نتائج ايجابية LDL المجفد في حفظ النطف بالتبريد او التجميد، ولكون استخلاص LDL ليست سهلة وتحتاج الى وقت وخطوات عديدة وكون LDL لا يمكن حفظه بالتبريد اكثر من 4– 5 أيام مما يحد من استخدامه بدل عن صفار البيض في مراكز التقيح الاصطناعي فقد جاء هذا البحث لدراسة امكانية تجفيد LDL وحفظه على شكل مسحوق في قناني معقمة وخزنه لفترات طويلة واستخدامه في مخفف TRIS لحفظ السائل المنوي بالتبريد ولمدة خمسة ايام لمعرفة تأثيره على خصائص النطف ومدى قابلته على الحفظ خلال مدة التبريد مما ينتج في حالة نجاح هذه العملية فتح افاق واسعة لاستخدامه في مراكز التلقيح الاصطناعي والاستعاضة عن صفار البيض الذي اضافه 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 وكانت اعمارهم تتراوح بين (2– 4) سنوات ووزن جسم يتراوح (52–

65) كغم وضعت في قطيع واحد، وتم ايواءها 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)، وكانت نسبة الطاقة في العليقة 2183.7 كيلو سعرة ونسبة البروتين 15.35%(28)، مع تقديم العلف الاخضر والتبن يومياً، أما الماء الصالح للشرب وقوالب الاملاح المعدنية فكانت متوفرة أمام الحيوانات مع أضافة Amino– UVEVIT الى ماء الشرب.

تصميم التجربة: اجريت هذه الدراسة للمدة من تموز 2015 ولغاية شباط 2016 وهي على 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 تجفيده، اما المرحلة الثانية من التجربة فكانت في اب 2015 في شركة الكندي للقاحات والمصول الواقعة في قضاء ابي غريب إذ تم تعبئة البروتينات واطئة الكثافة السائلة (LDL) في علب Vials معقمة وتجفيده في جهاز التجفيد (التجفيف 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 تجمع 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 (33) على معاملات التجربة بالتساوي حيث استخدم ثلاث تراكيز من LDL المجفد (3.2 و4.8 و6.4% للمعاملات T1 وT2 وT3 على التوالي) ومعاملة السيطرة 20% صفار البيض.

طريقة استخلاص LDL:

تم استخلاص البروتينات الدهنية واطئة الكثافة من صفار البيض الطازج حسب طريقة (26) وفق سلسلة من الخطوات لحين تنقيته وتعبئته في علب محكمة الغلق ومعقمة لحين تجفيفه بالتجميد.

طريقة تجفيد البروتينات الدهنية واطئة الكثافة

التجفيد lyophilisation (التجميد الجاف) drying freeze هو عبارة عن عملية سحب الرطوبة من المواد سريعة التلف وتحويلها من الحالة السائلة الى الحالة الصلبة خالية من الرطوبة لزيادة العمر الخزني 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 والمصول 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 صورة (1) تتلخص عملية التجفيف بما يأتي:===تم تقسيم LDL السائل يشكل متساوي بالوزن وتعبئته في علب معقمة إذ احتوى كل علبة 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. وتمت عملية التجفيد استناداً الى (19)

صورة 1 . المنتج النهائي علبLDL 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 خمسة دقائق لإذابة كل جزيئات LDL في المخفف وبعد ذلك يوضع في الحمام المائي على درجة حرارة 37 م ° ليكون نفس درجة حرارة السائل المنوي اثناء التخفيف.

صفات السائل المنوي:

الحركة الفردية: تم قياس النسبة المئوية للحركة الفردية للنطف حسب الطريقة التي اشار اليها (12).

نسبة النطف الحية والميتة:

قدرت النسبة المئوية للنطف الحية والميتة استنادا الى الطريقة التي اشار اليها (37).

سلامة الغشاء البلازمي: اختبار (HOST):- Hypoosmtic swelling Test، قدرت النسبة المئوية للنطف ذات الغشاء البلازمي السليم بحسب طريقة (8).

فحص سلامة الأكروسوم: تم تقدير النطف ذات الأكروسوم السليم باستخدام صبغة الجنشن البنفسجي– ومحلول الايوسين (Gentian Violet Solution-Eosin Solution) (15).

التحليل الاحصائي:

استخدم البرنامج SAS(35) 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 (13) واستخدم الأنموذجين الرياضيين الاتيين:

الانموذج الرياضي الاول: للتحري عن تأثير المعاملة لكل وقت:

$$Yij= \mu + T_i + eij$$

إذ ان:

Yij: قيمة المشاهدة j العائدة للمعاملة.

μ: المتوسط العام للصفة.

T_i: تأثير المعاملة المدروسة.

eij: الخطا العشوائي الذي يتوزع طبيعيا بمتوسط يساوي صفراً وتباين قدره $\sigma^2 e$.

الأنموذج الرياضي الثاني :للتحري عن تأثير الوقت لكل معاملة:

$$Yij= \mu + P_i + eij$$

إذ ان:

Pi: تأثير الوقت (ايام الحفظ).

اما باقي الرموز فهي كما وردت في الأنموذج الرياضي الاول المذكور آنفاَ.

النتائج والمناقشة

تأثير المعاملة والوقت في النسبة المئوية للحركة الفردية للنطف:

اوضحت نتائج الدراسة الجدول (1) وجود تأثير معنوي ($P<0.05$) لإحلال LDL المجفد محل صفار البيض الكامل في الحركة الفردية متأثرة بمدة الحفظ إذ تفوقت المعاملة الثالثة T2 (LDL %6.4) على بقية المعاملات في اليوم الثاني للحفظ إذ بلغت 75.00±2.18 مع عدم وجود فرق معنوي للمعاملة نفسها مع المعاملتين T1 وT2 اذ بلغت 69.3 ±3.71 و71.87±4.00% للمعاملتين المذكورة انفاَ على التوالي في حين انخفضت الحركة الفردية في معاملة السيطرة 60.62±6.00% مع عدم وجود فرق معنوي بين الاخيرة و المعاملتين T1 وT2، وفي اليوم الثالث لوحظ تفوق المعاملة T3 معنويا $P<0.05$ على معاملة السيطرة مع عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات T1 وT2 وT3 اذا بلغت نسبة الحركة الفردية لليوم الثالث 50.62 ±4.94 و49.37±4.16 و60.00± 5.00% للمعاملات على التوالي فيما بلغت الحركة الفردية لمعاملة السيطرة 4.85 ±39.37 % ولم يلاحظ فرق معنوي بين المعاملات T1 وT2 ومعاملة السيطرة وهذا يتفق مع نتائج (6) الذي تفوقت نتائج LDL المجفد على صفار البيض في دراستهم، في حين لم يلاحظ وجود فرق معنوي بين المعاملاتT1 وT2 وT3 ومجموعة السيطرة لليوم الاول والرابع والخامس للتبريد الجدول (1). وهذا ما يدل على قابلية LDL المجفد على حفظ نطف السائل المنوي للكباش وهذا يتفق مع دراسات اخرى إذ اشار(26) الى امكانية استبدال LDL محل صفار البيض في مخففات السائل المنوي، ان استخدام البروتينات الدهنية واطئة الكثافة LDL السائلة كان لها دور كبير في حماية النطف من صدمة البرودة كما اشار لها العديد من الباحثين (23 و26). من جانب اخر فيما يخص المقارنة بين الأيام فقد كان الفرق المعنوي واضح بين الأيام في المعاملة الاولى اذ تفوق اليوم الاول ($P<0.01$) على بقية

أيام الحفظ الاخرى اذ بلغت الحركة الفردية لليوم الاول في المعاملة الاولى 1.99 85.25 ±% وكانت ادنى نسبة مئوية للحركة الفردية في اليوم الخامس اذ بلغت 22.16± 4.04% مع وجود فروق عالية المعنوية (P<0.01) بين أيام الحفظ الخمسة (جدول 1). وفي المعاملة الثانية تفوق اليوم الاول معنويا (P<0.01) عند الحفظ بالتبريد على الأيام الاخرى إذ كانت نسبة الحركة الفردية 86.50±1.86% وقد انخفضت الحركة الفردية في اليوم الثاني للخزن اذا بلغت 71.87±4.00%، واستمر الانخفاض في الحركة الفردية في اليوم الثالث للحفظ مع وجود فرق معنوي بين اليوم الثالث والرابع والخامس ولم يلاحظ فرق معنوي بين اليومين الرابع والخامس جدول (1). وفي المعاملة الثالثة T3 اوضحت النتائج عدم وجود فرق معنوي بين اليومين الاول والثاني اذ بلغت الحركة الفردية 85.50±2.96 % و75.00±2.18% على التوالي مع تفوق معنوي P<0.01 لهذين اليومين على بقية أيام الحفظ، في حين انخفضت في اليوم الثالث والرابع للحفظ ولم يلاحظ فرق معنوي بينهما جدول (1). ومعاملة السيطرة كان التفوق P<0.01 لليوم الاول للحفظ على بقية أيام الحفظ اذ كانت الحركة الفردية 82.50±2.67% وانخفضت الحركة الفردية معنويا في اليوم الثاني والثالث وبلغ ادنى حركة فردية في اليومين الرابع والخامس ولم يلاحظ فرق معنوي بينها جدول (1). وقد كان الاختلاف في الحركة الفردية بين الأيام اعتمادا على نوع المعاملة إذ وجد في المعاملة الاولى والثانية كانت اعلى حركة فردية في اليومين الاول والثاني وبدأ الانخفاض بشكل تدريجي من اليوم الثالث للتبريد في حين في معاملة السيطرة كانت الحركة الفردية متفوقه في اليوم الاول فقط وبدأت بالانخفاض من اليوم الثاني واستمر الانخفاض الى ان وصلت ادناها في اليوم الرابع والخامس وهذا يتفق مع باحثين اخرين (2و16)وهذا بسبب التأثير الايجابي للLDL في حماية النطف لهذه الفترة والحفاظ على حركتها (6) اما بالنسبة لانحفاض حركة النطف بتقدم فترة الحفظ فانه يعود الى فترة الخزن إذ وجد (40) ان الانخفاض الحاصل في الحركة الفردية ناتج عن تضرر الغشاء البلازمي بسبب صدمة البرودة. ان التدهور الحاصل بالحركة الفردية الجدول (1) بتقدم الحفظ هو بسبب صدمة البرودة التي تتعرض لها النطف اثناء الحفظ بالتبريد الذي يؤدي الى استنزاف الكولسترول والايونات من النطف (20) إذ انخفضت الحركة الفردية بنسبة تتجاوز 50% او اكثر بتقدم فترة الخزن وهذا ينطبق مع نتائج (2 و14و21و33) وكذلك بسبب انتاج الاوكسجين التفاعلي ROS بزيادة فترة الحفظ (39) إذ انا الاجهاد التأكسدي في النطف تحدث بسبب اختلال التوازن بين نظام المضاد للأكسدة في الخلية وانتاج الاوكسجين للتفاعلي ROS (36).

تأثير المعاملة والوقت في النسبة المئوية للنطف الحية (كانون الثاني – شباط):

بينت نتائج الدراسة في الجدول (2) عدم وجود فرق معنوية بين المعاملات طيلة أيام فترة الحفظ وهذا يتفق مع (2) إذ لم يجد تأثير لنوع المخفف عند استخدامه اكثر من نوع من المخففات، اما بين الأيام فقد كان الاختلاف بين الأيام اعتمادا على نوع المعاملة في الدراسة إذ لوحظ في المعاملة الاولى تفوق اليوم الاول معنويا (P<0.01)على بقية أيام فترة الحفظ بالتبريد إذ بلغت نسبة النطف الحية في اليوم الاول 91.75±1.56%، وقد انخفضت نسبة النطف الحية في الأيام الاخرى للحفظ ولم يلاحظ فرق معنوي بينها (الجدول،2) وفي المعاملة الثانية ايضا كان التفوق عالي المعنوية (P<0.01) لليوم الاول من الحفظ اذ كانت نسبة النطف الحية94.75± 0.45%، وانخفضت في الأيام في الأيام الاخرى للحفظ مع عدم وجود فرق معنوي بينها (الجدول، 2)،في حين لوحظ في المعاملة الثالثة حصول تدهور وانخفاض عالي المعنوية (P<0.01) في اليوم الرابع والخامس البالغة 85.25± 2.13 و81.33 ±2.18% مقارنة مع اليوم الاول إذ بلغت 93.00± 1.94%، مع عدم وجود فروق معنوية بين الأيام الثلاثة الاولى من فترة الحفظ والتي بلغت 93.00± 1.94و± 2.15 88.57 و87.44±1.17% على التوالي، وعدم وجود فرق معنوي بين الأيام الثالث والرابع من جهة وبين الأيام الرابع والخامس من جهة اخرى (جدول، 2) ،وفي معاملة السيطرة كان التفوق معنوي (P<0.05) لليومين الاول والثاني إذ بلغت نسبة النطف الحية في هذه المعاملة 89.12± 2.64% و 2.14 87.62±% للأيام المذكورة على التوالي ولم يوجد بينهما وبين اليومين الثالث في حين انخفضت معنويا في اليوم

الخامس اذ بلغت نسبة النطف الحية 77.16± 1.64% مع عدم وجود فرق معنوي بين الأيام الثلاثة الاخيرة (الجدول، 2)، وهذا ما يدل على قابلية LDL على حفظ حيوية النطف والذي بدوره يؤدي الى ارتفاع نسبة النطف الحية مقارنة مع نسبة النطف الميتة في السائل المنوي لاسيما ان التدهور الحاصل في انخفاض نسبة النطف الحية بتقدم مدة الحفظ بسبب انخفاض درجة الحرارة وهذا ما أشار اليه (2).

تأثير المعاملة والوقت في النسبة المئوية للنطف ذات الغشاء البلازمي السليم (كانون الثاني– شباط):

اوضحت نتائج الدراسة الجدول (3) عدم وجود فرق معنوي بين معاملات LDL ومعاملة السيطرة في اليومين الاول والثاني للحفظ بالتبريد، اما في اليوم الثالث فقد تفوقت المعاملة الثانية والثالثة معنويا (P<0.05) على المعاملة الاولى T1 إذ بلغت 78.12± 2.29 و81.11±2.73 و65.00 ± 6.87% للمعاملات T2 وT3 وT1 على التوالي، مع عدم وجود فرق معنوي بين المعاملتين T2 وT3 ومجموعة السيطرة كذلك عدم وجود فرق معنوي بين T1 ومجموعة السيطرة، اما في اليوم الرابع فقد تفوقت المعاملات T2 وT3 معنويا (P<0.05) في حين انخفضت معنويا P<0.05 في المعاملة T1 وانخفضت ادناها في معاملة السيطرة مع عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات T1 وT2 وT3 من جهة وبين المعاملة T1 ومعاملة السيطرة من جهة اخرى (جدول، 3)، وفي السياق نفسه في اليوم الخامس للحفظ بالتبريد لوحظ التفوق المعنوي (P<0.05) للمعاملتين T2 وT3 في حين انخفضت في المعاملة T1 إذ كانت النسبة المئوية للنطف سليمة الغشاء البلازمي مع عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات الثلاث لل LDL وقد بلغت ادناها في معاملة السيطرة 3.96 55.83 ± % مع عدم وجود فرق معنوي بين المعاملة T1 ومعاملة السيطرة (الجدول، 3) واتفقت هذه النتيجة مع نتائج (6) الذي لاحظ تفوق معاملات LDL المجفد في تركيز 4% على معاملة صفار البيض التي بلغت نسبة النطف سليمة الغشاء البلازمي فيها 16.0 ± 10.5% وفي معاملات LDL المجفد بلغت (14.5 ± 3.0 و18.3 ± 10.6 و17.3 ± 9.4 و11.2 ± 6.3)% للتراكيز 2 و4 و6 و8% على التوالي. ولمقارنة فترات الحفظ بالتبريد فقد لوحظ عدم وجود فرق معنوي بين الأيام للمعاملة الاولى (جدول، 3)، اما في المعاملة الثانية فقد لوحظ تفوق اليوم الاول على بقية أيام التجربة إذ بلغت اعلى نسبة للنطف ذات الغشاء السليم في اليوم المذكور 92.50±1.62% وفي اليوم الثاني فقد انخفضت نسبة النطف السليمة الغشاء البلازمي واستمر الانخفاض مع عدم وجود فرق معنوي لليوم الثالث كذلك انخفضت في اليوم الرابع مع عدم وجود فرق معنوي بين اليومين الثالث والرابع وبلغت ادنى نسبة معنويا للنطف ذات الغشاء السليم في اليوم الخامس إذ كانت 67.16± 3.37% مع عدم وجود فرق معنوي بين اليوم الرابع والخامس (جدول، 3) ،وفي المعاملة الثالثة T3 فقد لوحظ تفوق عالي المعنوية (P<0.01) في اليوم الاول على بقية أيام الحفظ الاخرى إذ كانت اعلى نسبة معنويا للنطف ذات الغشاء البلازمي السليم في اليوم الاول وكانت92.62± 1.47%، في حين انخفضت في الأيام الاخرى للحفظ ولم يلاحظ فرق معنوي بين الأيام الثاني والثالث والرابع، وقد بلغت ادناها معنويا في اليوم الخامس للتبريد إذ كانت 66.66± 2.49% (الجدول، 3)، اما في معاملة السيطرة فقد تفوق اليوم الاول عالي المعنوية (P<0.01) في نسبة النطف السليمة الغشاء البلازمي اذ بلغت 88.62± 1.97%، وقد انخفضت نسبة النطف السليمة الغشاء البلازمي تدريجيا في الأيام الاخرى إذ لم يلاحظ فرق معنوي بين الأيام الثاني والثالث، واستمر الانخفاض المعنوي في اليوم الرابع والخامس ولم ويلاحظ فرق معنوي بين اليومين الرابع الخامس (جدول، 3)، وقد وجدت فروق معنوية بين الأيام باختلاف نوع المعاملة للتجربة الاولى بسبب التعرض لصدمة البرودة خلال فترة الحفظ ولمدة خمسة أيام إذ يتأثر الغشاء البلازمي اثناء الحفظ بالتبريد بسبب اكسدة الدهون الموجودة في الغشاء البلازمي (32) كذلك بسبب تغيير في نفاذية الغشاء مما يؤدي الى فقدان الانزيمات والكاتيونات (7) إذ يعتقد ان عملية التجفيد تكون قد اثرت على قابلية LDL في تكوين الطبقة الواقية للنطف كما ان الطبقة المتكونة من المجفد اقل قابلية على حماية النطف من صدمة البرودة بتقدم فترة الحفظ بالتبريد مما قد تؤدي الى زيادة استنزاف الكولسترول من الغشاء البلازمي كلما زادت فترة الحفظ بالتبريد وذلك هو السبب الذي ادى الى عدم وجود الفرق المعنوي بين معاملات التجربة باستخدام

تراكيز مختلفة للـ LDL المجفد ومعاملة السيطرة عند استخدام صفار البيض بنسبة 20% في اليومين الاول والثاني للحفظ (27).

4-3-4- تأثير المعاملة والوقت في النسبة المئوية للنطف ذات الأكروسوم السليم (كانون الثاني– شباط):

اما بالنسبة للنطف ذات الأكروسوم السليم، فقد تباينت نتائج التجربة بين المعاملات باختلاف فترة الحفظ (جدول، 4) في اليوم الاول حصول تفوق معنوي ($P<0.05$) للمعاملة T2 على المعاملة T1 ومجموعة السيطرة اذ بلغت النطف السليمة الأكروسوم 96.87 ± 0.44% و94.25 1.25% ± و94.37 ± 0.70% للمعاملات T2 وT1 ومجموعة السيطرة على التوالي، كما بينت النتائج عدم وجود فرق معنوي بين المعاملة T1 ومجموعة السيطرة من جهة و بين T1 وT3 من جهة اخرى اذ بلغت ± 0.65 96.62% للمعاملة T3 كذلك عدم وجود فرق معنوي بين T2 وT3 من جهة وبين T3 ومجموعة السيطرة من جهة اخرى، وفي اليوم الثاني كان التفوق المعنوي ($P<0.05$) للمعاملة T2 على مجموعة مع عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات T1 وT2 وT3، ولم يوجد فرق معنوي بين T1 وT3 من جهة ومجموعة السيطرة من جهة اخرى، ولم يلاحظ فرق معنوي لليومين الثالث والرابع بين المعاملات المختلفة ومجموعة السيطرة، في حين كان التفوق عالي المعنوية ($P<0.01$) في اليوم الخامس للمعاملة T2 وT3 على مجموعة السيطرة إذ كانت نسبة النطف السليمة الأكروسوم 85.33 ± 0.80 و85.66 ± 1.52 و± 1.13 79.16% للمعاملات T2 و T3ومجموعة السيطرة على التوالي مع عدم وجود فرق معنوي بين T1 ومعاملة السيطرة جدول اذ بلغت 82.83± 1.70% للمعاملة T1(الجدول 4) وهذا يتفق مع نتائج الدراسات التي استخدمت LDL بشكل سائل طازج وبتراكيز مختلفة في حماية الأكروسوم من صدمة البرودة مقارنة مع مخففات صفار البيض (26 و30و31) ونفسها في نطف الكلاب في دراسة (10) وفي نطف الماعز ايضا (3) لكن (27) ايضا لاحظ تفوق LDL الطازج في حين انخفضت عند استخدام LDL مجفد، اما بين الأيام فقد لوحظ انخفاض عالي المعنوية ($P<0.01$) في النسبة المئوية للنطف سليمة الأكروسوم في اليوم الرابع والخامس مقارنة باليوم الاول من جهة وكذلك بين اليوم الخامس مقارنة باليوم الثاني والثالث من جهة اخرى، مع عدم وجود فرق معنوي بين الأيام الثلاثة الاولى ولا بين اليومين الاخيرين (الجدول، 4)، اما في المعاملة الثانية فقد لوحظ اعلى نسبة معنويا ($P<0.01$) للنطف السليمة الأكروسوم في اليوم الاول للحفظ في التبريد وقد انخفضت في الأيام الاخرى تدريجيا مع عدم وجود فرق معنوي بينهما، في حين بلغت في اليوم الرابع 89.37± 1.25% مع عدم وجود فرق معنوي بين اليومين الثالث والرابع واستمر الانخفاض الى ان وصل ادناه معنويا ($P<0.01$) في اليوم الخامس إذ بلغت 85.33± 0.80% (الجدول 4)، وفي معاملة T3 لوحظ تفوق عالي المعنوية ($P<0.01$) اليوم الاول مقارنة مع الأيام الاخرى للحفظ إذ بلغت نسبة النطف السليمة الأكروسوم 0.65 96.62 ±% في حين لم يلاحظ فرق معنوي بين الأيام الثاني والثالث، وانخفضت نسبة النطف السليمة ادناها في اليوم الخامس (الجدول،4). ان التدهور الحاصل في نسبة النطف ذات الأكروسوم السليم يعود الى التأثر بسبب طول فترة الحفظ والتعرض للبرودة بشكل كبير إذ اشار كل من (9 و25 و40) ان عملية التبريد يمكن ان تحافظ على النطف وحيويتها وخصوبتها لمدة 24– 84 ساعة وقد تصل الى 96 ساعة دون انخفاض كبير لكنها تنخفض بزيادة فترة الحفظ اما في مجموعة السيطرة فقد كان التفوق لليوم الاول فقط على بقية أيام الحفظ إذ كانت نسبة النطف السليمة الأكروسوم في هذا اليوم 94.37 ± 0.70، ولم يلاحظ فرق معنوي بين الأيام الثاني والثالث والرابع في نسبة النطف السليمة الأكروسوم في حين بلغت ادناها في اليوم الخامس إذ كانت 79.16± 1.13 (جدول، 4). ان النظرية الاكثر ثبوتا في الية عمل LDL في حماية النطف هي نظرية (23) التي اشار فيها الى ارتباط LDL مع بروتينات البلازما المنوية في الثيران BSPs والذي بدوره يقلل من الاستنزاف الحاصل في الكولسترول من الغشاء البلازمي وبذلك يحافظ على حيوية النطف وحركتها التقدمية وقد لاحظ (11) نفس التأثير في نطف الكباش عند استخدام LDL بشكل سائل إذ وجد بروتينات مماثلة لما موجود في الأبقار في السائل المنوي للكباش ويعتقد ان لها نفس العمل وتسمى بروتينات البلازما

المنوية للكباش (RSPs) Ram Seminal plasma Proteins.

جدول 1. تأثير المعاملة والوقت في النسبة المئوية للحركة الفردية للنطف لدى الكباش العواسي عند اضافة نسب مختلفة من LDL المجفد (المتوسط ± الخطأ القياسي)

المعاملة	الحركة الفردية للنطف (%) بعد التبريد بـ (يوم)				
	الاول	الثاني	الثالث	الرابع	الخامس
T1	1.99± 85.25	3.71±69.37	4.94±50.62	6.16 ±35.75	4.04±22.16
	A a	AB b	AB c	A d	A e
T2	1.86±86.50	4.00±71.87	4.16±49.37	6.04 ±36.87	4.87 ±25.33
	A a	AB b	AB c	A cd	A d
T3	2.96±85.50	2.18±75.00	5.00±60.00	6.80 ±33.12	4.08 ±25.00
	A a	A a	A b	A c	A c
السيطرة	2.67±82.50	6.00±60.62	4.85 ±39.37	6.33 ±23.37	3.74 ±14.16
	A a	B b	B c	A d	A d

المتوسطات التي تحمل حروف كبيرة مختلفة ضمن العمود الواحد (بين المعاملات) وحروف صغيرة مختلفة ضمن الصف الواحد (بين الأيام) تختلف معنويا فيما بينها (P<0.0)، T1: 3.2% LDL مجفد/ T2: 4.8% LDL مجفد/ T3: 6.4% LDL مجفد/ السيطرة 20% صفار البيض.

جدول 2. تأثير المعاملة والوقت على النسبة المئوية للنطف الحية لدى الكباش العواسي عند اضافة نسب مختلفة من LDL المجفد (المتوسط ± الخطأ القياسي)

المعاملة	النطف الحية (%) بعد التبريد بـ (يوم)				
	الاول	الثاني	الثالث	الرابع	الخامس
T1	1.56±91.75	1.62 ±85.73	2.20 ±82.25	2.32 ± 85.00	1.45 ±82.50
	A a	A b	A b	A b	A b
T2	0.45±94.75	1.66 ±87.00	2.15 ±86.25	1.95 ± 85.37	2.36 ±82.66
	A a	A b	A b	A b	A b
T3	1.94 ±93.00	2.15 ±88.57	1.17 ±87.44	2.13 ±85.25	2.18 ±81.33
	A a	A ab	A ab	A bc	A c
السيطرة	2.64 ±89.12	2.14 ±87.62	3.80 ±82.50	2.31 ±82.00	1.64 ±77.16
	A a	A a	A ab	A ab	A b

المتوسطات التي تحمل حروف كبيرة مختلفة ضمن العمود الواحد (بين المعاملات) وحروف صغيرة مختلفة ضمن الصف الواحد (بين الأيام) تختلف معنويا فيما بينها(P<0.01)، T1: 3.2% LDL مجفد/ T2: 4.8% LDL مجفد/ T3: 6.4% LDL مجفد/ السيطرة 20% صفار البيض

جدول 3. تأثير المعاملة والوقت على نسبة سلامة الغشاء البلازمي لدى الكباش العواسي عند اضافة نسب مختلفة من LDL المجفد (المتوسط ± الخطأ القياسي)

المعاملة	النطف ذات الغشاء البلازمي السليم (%) بعد التبريد بـ (يوم)				
	الاول	الثاني	الثالث	الرابع	الخامس
T1	6.47 ±83.05	9.57 ±71.87	6.87 ±65.00	3.59 ±67.25	3.72 ±62.83
	A a	A a	B a	AB a	AB a
T2	1.62 ±92.50	2.48 ±83.50	2.29 ±78.12	3.15 ±74.50	3.37 ±67.16
	A a	A b	A bc	A cd	A d
T3	1.47 ±92.62	2.78 ±82.28	2.73 ±81.11	2.78 ±74.75	2.49 ±66.66
	A a	A b	A b	A b	A c
السيطرة	1.97 ±88.62	2.75 ±79.25	3.31 ±71.00	4.00 ±63.12	3.96 ±55.83
	A a	A b	AB bc	B cd	B d

المتوسطات التي تحمل حروف كبيرة مختلفة ضمن العمود الواحد (بين المعاملات) وحروف صغيرة مختلفة ضمن الصف الواحد (بين الأيام) تختلف معنويا فيما بينها (P<0.01)، T1 : 3.2% LDL مجفد/ T2: 4.8% LDL مجفد/ T3: 6.4% LDL مجفد/ السيطرة 20% صفار البيض

جدول 4. تأثير المعاملة والوقت على سلامة الأكروسوم لدى الكباش العواسي عند اضافة نسب مختلفة من LDL المجفد (المتوسط ± الخطأ القياسي)

المعاملة	النطف ذات الأكروسوم السليم (%) بعد التبريد بـ (يوم)				
	الاول	الثاني	الثالث	الرابع	الخامس
T1	1.25±94.25	1.59±91.12	1.60 ±89.50	1.88 ±87.50	1.70 ±82.83
LDL%3.2	B a	AB ab	A ab	A bc	AB c
T2	0.44 ±96.87	0.82 ±93.62	1.32 ±92.12	1.25 ±89.37	0.80 ±85.33
LDL%4.8	A a	A b	A bc	A c	A d
T3	0.65 ±96.62	1.25 ±92.00	1.28 ±92.66	1.51 ±90.12	1.52 ±85.66
LDL%6.4	AB a	AB b	A b	A b	A c
السيطرة	0.70 ± 94.37	1.75 ±88.87	2.04 ±87.75	1.88 ±85.00	1.13 ±79.16
	B a	B b	A b	A b	B c

المتوسطات التي تحمل حروف كبيرة مختلفة ضمن العمود الواحد (بين المعاملات) وحروف صغيرة مختلفة ضمن الصف الواحد (بين الأيام) تختلف معنويا فيما بينها (P<0.01)، T1: 3.2% LDLمجفد / T2 : 4.8 % LDLمجفد / T3 : 6.4 % LDLمجفد / 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. Theriogenology62 809-818.
2. 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 , Vol(5), Issue 2, 234-243.
3. Ali Al -Ahmad, M. Z.; Chatagnon, G.; Amirat-Briand, L.; Moussa, M.; Tainturier, D.; Anton M. 2008. Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. Reprod. Domest. Anim;43:429-436.
4. Alvarez, M.; Castro, D.; Muro, J.; Martinez-Pastor, F.; Mata-Campuzano, M.; García, C.; Anel, L.; Paz, P. 2008 Effect of different LDL concentrations in the freezing extender on semen quality of frozen-thawed ram spermatozoa. Bio. Reprod.,. 78;.114-259.
5. Amirat, L., Tainturier, D.; Jeanneu, L.; Gerard, O.; Courtens, J.L.; and Thorin, C.; 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. Theriogenology, 61: 895-907.
6. Ana, M. L.E.; Betina, C. C.; Paola, P. N. S.; Luís, C.O.M.; Beatriz,P.N.; Mariana,M.N.; Luiz, G. D.H.; Marc, H.2015.Low density lipoproteins added to an extender frozen or lyophilized are evenly efficient in cryoprotecting ovine sperm cells than when 16% whole egg yolk was added. Semina: CiênciasAgrárias, Londrina, 36(3) ;1335-1346.
7. Bailey JL.; Bilodeau JF.; Cormier N.; 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. J Androl;21:1-7.
8. Banana H.J.H.2014. Study of some morphological, physiological and reproductive parameters of Iraqi Goitered gazelle (gazelle subguttrosa) .Ph.D Dissertation College of Agriculture –University of Baghdad.
9. Batellier, F. Vidament, M.; Fauquant, J.; Duchamp, G.; Arnaud, G.; Yvon, J.M.; and Magistrini, M.; 2001. Advances in cooled semen technology. Anim. Reprod. Sci.; 68:181-190.
10. Bencharif D.; Amirat L.; Anton M.; Schmitt E.; Desherces S.; Delhomme G.; Langlois ML.; Barrie`re P.; Larrat M.; Tainturier D. 2008. The advantages of LDL (Low Density Lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. Theriogenology.; 70: 1478–1488.
11. Bergeron A.; Crête MH.; Brindle Y.; Manjunath P. 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. Biol. Reprod., 70:708-717.
12. Chemineau, P.; Cagnie Y.; Guerin Y.; Orgeur P. and Vallet J.C, 1991. In: Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats.FAO Anim. Prod Hlth. Paper 82, Rome,: 115-161.
13. Duncan, D. 1955. Multiple Ranges and Multiple F-test. Biometrics., 11:1-24.
14. Gundogan M.; Tekerli M.; Ucar, M. and Turkmenoglu, I. 2003. Effect of diluents on motility of ram sperm during storage at 5ºC. Arch. Androl.,; 49: 69–75.
15. Hancock, J. L. 1946. Morphology of bull spermatozoa. Nature., 157:447.
16. Hussain SA, Lessard C, Anzar M.2004.Quantification of damage at different stages of cryopreservation of endangered North American bison (Bison Bison) semen and the effects of extender and freeze rate on post-thaw sperm quality. AnimReprod Sci;129:171-9.
17. Ivanov, I.I., 1907. De la fe´condationartificielle chez les mammife`res. Arch. Sci. Bio. Inst. Imp. Me´d. Exp., St Pe´tersbourg 12, 377–511.
18. Ivanov, I.I., 1912. Artificial Fecondation of Domestic Animals. Schaper, Hannover.
19. Jennings T. A. 1997. Effect of formulation on lyophilization. Asian Journal of Pharmaceutical Science, , 54-63.
20. Jeyendran ,R.S.; Van Der Vem, H.H.; Perez-Pelaez, M.; Crabo, B.G.; Zaneveld, L.J. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J Reprod Fertil;47:219 –228.

21. Kasimanickam R.; Kasimanickam V.; Pelzer K.D.; Dascanio J.J. 2007. Effect of breed and sperm concentration on the changes in structural, functional and motility parameters of ram-lamb spermatozoa during storage at 4ºC. Anim. Reprod. Sci.,; 101: 60-73.

22. Manjunath P. 2012 . New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. Anim. Reprod , p.809-815.

23. Manjunath, P.; Nauc, V.; Bergeron, A. and Menard, M. 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. Biol. Reprod., 67: 1250-1258.

24. Maxwell, W.M.C. and Salamon, S. 1993. Liquid storage of ram semen: a review. Reprod. Fertil. Dev. 5:613–638.

25. Medeiros, C. M. O.; Forell, F. Oliveira, A. T. D. Rodrigues, J. L. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?, Theriogenology Vol. 57; 327-344.

26. 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.

27. Moustacas, V. S.; Zaffalon, F. G.; Lagares, M.A.; Loaiza-Eccheverri, A.M.; Varago, F. C.; Neves M. M.; 2011. Natural, but not lyophilized, low density lypoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. Theriogenology;75:300-7.

28. N.R.C. 1994. National Research Council,; National Academy Press Washington , D.C.

29. Neves, M. M.; Heneine, L. G. D.; Henry, M.; Escola. V.; Belo-Horizonte, M. G. Fundação, E. D. 2014. Cryoprotection effectiveness of low concentrations of natural and lyophilized LDL (low density lipoproteins) on canine spermatozoa.Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 66, (3);769-777.

30. Nur, Z.; Zik, B.; Ustuner, B.; Sagirkaya, H.; Ozguden, C.G. 2010. Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity Theriogenology 73:1267–1275.

31. Quinn, P.J. White, I.G. Cleland, K.W. 1969. Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. J Reprod Fertil;18:209 –220.

32. Ricker, J.V.; Linfor, J.J.; Delfino, W.J.; Kysar, P.; Scholtz, E.L.; Tablin, F. 2006. Equine sperm membrane phase behavior: The effects of lipid-based cryoprotectants. Biol Reprod;74:359-65.

33. Salamon, S. and Maxwell ,W.M. 2000. Storage of ram semen. Anim.Reprod.Sci, 62:77-111

34. Salamon, S. and Maxwell W.M.C. 1995. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement.Anim. Reprod. Sci.;38:1–36.

35. SAS . 2012 . SAS \STAT User ,s Guide for personal Computers .Release 9.1 SAS Institute Inc ,Cary .N.C.,USA .

36. Sies, H. 1986. Biochemistry of Oxidative Stress. Angewandte Chemise International Edition in English, 25:1058-1071.

37. Swanson, EW, Bearden, HJ. 1951. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. J Anim. Sci., 10:981-987.

38. Tonieto, R. A.. 2008. Uso de diferentescrioprotetoresemdiluentesparasêmen ovinocongelado. Dissertação (Mestradoem Veterinária) – Programa de Pós-Graduaçãoem Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

39. Watson, P. F. .1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reproduction Fertility and Development, 7: 871- 891.

40. Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim. Reprod. Sci;60:481-92.

41. 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 ..actaagriculturae it, 23 (6) : 112-115.