تأثير احلال البروتينات الدهنية الواطئة الكثافة المستخلصة من صفار البيض على بعض صفات السائل المنوي لدى ثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتجميد

أحمد باسم عبداللطيف العاني* عبدالكريم عبدالرضا هوبي فارس فيصل الشيوخ
باحث أستاذ باحث علمي أقدم
[1و2] قسم الثروة الحيوانية – كلية الزراعة – جامعة بغداد [3] مركز التلقيح الاصطناعي – وزارة الزراعة
ahmmadbassim@yahoo.com

المستخلص

أجريت هذه الدراسة بهدف معرفة تأثير أحلال البروتينات الدهنية الواطئة الكثافة المستخلصة من صفار البيض بتراكيز مختلفة الى مخفف Tris في بعض صفات السائل المنوي لثيران الهولشتاين بعد الحفظ بالتبريد والتجميد لمدد مختلفة. أجريت هذه التجربة للفترة من ايلول 2014 حتى اذار 2015، وعلى قسمين المرحلة الاولى من ايلول الى تشرين الاول /2014 لأجراء أستخلاص البروتينات الدهنية المنخفضة الكثافة low Density Lipoproteins (LDL) والتي أجريت في مختبر الفايروسات قسم التشخيص التابع لدائرة وقاية المزروعات – وزارة الزراعة الواقعة في قضاء ابي غريب غربي بغداد، وفيها تم استخلاص LDL وذلك من خلال سلسلة عمليات وتمت تنقيته وتعبئته بوزن ثابت في قناني زجاجية صغيرة معقمة معدة لهذا الغرض، المرحلة الثانية بدأت من تشرين الاول حتى اذار /2015 و أجريت في مركز التلقيح الاصطناعي في ابي غريب التابع لدائرة الثروة الحيوانية – وزارة الزراعة (25 كم غربي بغداد).وذلك بأستعمال 4 ثيران هولشتاين باعمار تتراوح بين 3 – 3.5 سنة . تم جمع السائل المنوي بالمهبل الاصطناعي وبواقع قذفة واحده/ ثور/ اسبوع. تم أخذ 1 مل من السائل المنوي/ثور لعمل تجميع السائل المنوي (Pooled Semen) لغرض ازالة الفروق الفردية بين الثيران .بعد عملية جمع السائل المنوي تم تقسيم السائل على معاملات التجربة الاربعة بالتساوي (1مل/معاملة) وأستخدام مخفف Tris أضيف صفار بيض بنسبة 20% الى مجموعة السيطرة وتم احلاله لبقية المعاملات البروتينات دهنية واطئة الكثافة وبتراكيز مختلفة اذ بلغت (8 و 10 و 12 %). وتمت دراسة تأثير هذه الاضافات في صفات السائل المنوي في مدد حفظ مختلفة (التبريد عند 5 مْ) وتجميد بعد (48 ساعة وشهر واحد وشهرين وثلاثة أشهر). بينت نتائج التجربة أن أضافة LDL 8%(T1) ادت الى حصول زيادة معنوية (P<0.05) في الحركة الفردية للنطف وسلامة الاكروسوم وسلامة الاغشية البلازمية للنطف مقارنة مع مجموعة السيطرة (control) لكافة مدد الحفظ بالتبريد والتجميد .

كلمات مفتاحية: بروتينات دهنية واطئة الكثافة، حفظ بالتجميد، ثيران، السائل المنوي .

*البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences – 47(1): 343-350, 2016 Al-Ani & et al.

EFFECT OF EXTRACTED LOW DENSITY LIPOPROTEINS SUBSTITUTION ON SOME POST CRYOPRESERVATION SEMEN QUALITY OF HOLSTEIN BULLS

[1] A.B. A. Al-Ani * [2]A. A. Hubi [3] F. F.AL-Shuik
Researcher Prof. Researcher
[1,2] Dep .of Animal Resources - Coll. of Agric., Univ .of Baghdad
[3]-Artificial insemination center
ahmmadbassim@yahoo.com

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of replacement of low density Lipoproteins (LDL) in different concentrations ,exctracted fram egg yolk in the Tris diluents of the Holestion Freizan bulls semen after cooling and different cryopreservation periods . This study was done during the period From September/2014 to March/2015 and a two parts periods . First from September to November /2014 to done the extraction of the low density Lipoprotein which it have be succifully done at the viruses Laportary which belonge to the diagnosis department /state Board of the plant protection /Ministry of AgricIturd (Abu_Gruiab/west of Baghdad).The LDL extraction was done by a procedure with different steps from fresh egg Yolk and the packeges were done after that and preservie it at Refregartor(5c ,one week only) until used . The second period was began from December/2014 to March/2015 At the Artificial insemination Department /Abu_Gruab which belonge to the General company of the Animal Resources Department services/Ministry of Agricultural (25 Km west of Baghdad). Four Freigan Bulls at 3_3.5 year old were used to collection the semen (1 eijaculate / bull / week) by artificial vagina . 1 millelitter of semen from each bull was taken and make pooling . Egg yolks was added 20% to the control group it is substituted for the rest of the Low density lipoproteins and different concentrations , amounting to (8% LDL and 10% LDL and 12% LDL). And study the effect of these additions in recipes semen during different periods of Save (cooling 5c) and freeze after(48 hours and one month and two months and three months) .The results of the study reveled that the 8% LDL treatment (T1) group have a significant effect (p≤0.05) on the individual motility ,sperm plasma membrane and acrosome integrity in comparable with the control group at different periods of the preservation.

Key words : low density Lipoproteins , cryopreservation , bull , semen .

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

المقدمة

تتضمن عملية تجميد النطف تعرضها للتغيرات في الدرجات الحرارية المنخفضة جداً، مما يسبب تعرض النطف الى صدمة البرودة (1)، لذلك فقد كانت اضافة صفار البيض الى مخففات السائل المنوي منذ وقت ليس بالقصير لتقليل حدوث صدمات البرودة (2). وهناك عوامل اخرى تؤثر في حيوية النطف عند الحفظ بوساطة التجميد، منها نوع المخفف(3)، وطريقة التجميد(4 و5)، ونوع المواد الحافظة أو تركيزها (6)، وان هذه العوامل مجتمعة هي التي تحدد نجاح عملية التجميد. يشكل صفار البيض نسبة من وزن البيضة الكلية حوالي 36 % (7). وتصل نسبة البروتينات الدهنية المنخفضة الكثافة LDL في صفار البيض الى 68% وهي اعلى نسبة من مكونات صفار البيض) بينما تشكل البروتينات الدهنية العالية الكثافة (HDL) High densiry lipoprotein 16% من مكونات صفار البيض، اما البروتينات globular protein التي تسمى Liveting فأنها تشكل فقط 10% نسبة صفار البيض. اما البروتينات الحاوية على الفوسفات والتي تسمى ب(phosvitin) فأنها نسبتها تصل الى 4% وهناك بروتينات ثانوية تشكل حوالي 2% من صفار البيض. لذلك جاء الأعتقاد بأن الجزء من صفار البيض المسؤول عن توفير هذه الحماية (ضد صدمة البرودة) يعود الى البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة (8) لذلك فقد لوحظ في الدراسات السابقة التي اجريت أن اضافة LDL بدلاً من صفار البيض الكامل في مخففات السائل المنوي كان لها الأثر الكبير في حفظ حيوية السائل المنوي بعد الأسالة (9، 10، 11). البروتينات الدهنيه الواطئة الكثافه LDL تشكل حوالي ثلثي من إجمالي المواد الصلبة الموجوده في صفار البيض، تقدر كثافته LDL ب 0,982 غم / مل، وهي عباره عن جزيئات كروية يتراوح قطرها بين 17 – 60 نانومتر، مع مجموعة أساسية من الدهون الثلاثية والكوليسترول و فسفوليبيد والبروتين (9). لذلك هدفت الدراسة الحالية الى امكانية استخلاص LDL و أستخدامها بديلاً عن صفار البيض في مخففات السائل المنوي لثيران الهولشتاين وتأثيرهما في حيوية النطف المجمدة.

مواد والطرائق

استخلاص البروتينات الدهنية الواطئة الكثافة: تم استخلاص البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة من صفار بيض الدجاج حسب طريقة (9) وكما يأتي:

1–تم أخذ بيض دجاج طازج غير مخصب، تم تنظيف البيض وتعقيمه بالكحول لمنع التلوث وكسر البيض و التخلص من الالبومين ووضع الصفار على ورقة ترشيح ودحرجته للتخلص من بقايا الالبومين والكلازا (Chalazae) تم كسر غشاء المح Vitellin membrane بمشرط طبي معقم ثم جمع الصفار في بيكر زجاجي محاط بالثلج.

2– تم فصل البلازما المحتوية على ال LDL حسب طريقة (1)، تم خلط صفار البيض مح محلول ملحي متساوي التوتر(Nacl 0.17M)، تم خلط صفار البيض مع المحلول الملحي (Nacl 0.17M) وخلطها جيدا لمدة ساعة، فصلت البلازما بجهاز الطرد المركزي المبرد وبسرعة x 1000 دورة/دقيقة لمدة 45 دقيقة وبدرجة حرارة 10 مْ يترك الراسب وتأخذ البلازما وتعاد عملية الطرد المركزي لمرة ثانية في الظروف نفسها وذلك لضمان النقاوة .

3–تم مزج البلازما مع 40% كبريتات الامونيوم(شركة China– SCR) ولمدة ساعه على ان تتم المحافظة على ال pH =8.7 ودرجة حراره 4 مْ، تنقل البلازما الى جهاز الطرد المركزي وبسرعة x 10000 دورة/دقيقة لمدة 45 دقيقة وتاخذ الطبقة الطافيه (السائله) وتوضع في اكياس ديلزه وتوضع في ماء مقطر بدرجة حرارة 8 – 4 مْ ولمدة 6 ساعات للتخلص من كبريتات الامونيوم، بعدها تجرى عملية الطرد المركزي وبسرعة x 10000 دورة/دقيقة لمدة 45 دقيقة ولكن حددناها 50 دقيقة لضمان الفصل والترسيب وبدرجة حرارة 10 مْ ليتم الحصول على LDL وبشكل طبقه طافيه على سطح السائل ذات لون اصفر ويتم جمعه والاحتفاظ به في انابيب خاصة ومعقمة وأستخدامها عند اجراء المعاملة وتوضع في الثلاجة (بدرجة حرارة 4مْ) لاستعماله خلال اسبوع.

جمع وتخفيف وتجميد السائل المنوي

اجريت هذه التجربة للمدة من تشرين الاول وحتى اذار /2015 في قسم التلقيح الاصطناعي في ابي غريب التابع لدائرة الثروة الحيوانية – وزارة الزراعة (25 كم غرب بغداد). وذلك بأستعمال 4 ثيران هولشتاين باعمار تتراوح بين – 3.5 3 سنه تم جمع السائل المنوي بالمهبل الاصطناعي وبواقع

قذفة واحدة/ ثور/ اسبوع. ثم مزج العينات (Pooled Semen)وتخفيفه بنسبة 10:1 وتم تقسيم السائل على معاملات التجربة الاربعة بالتساوي (1مل/معاملة) وأستخدام مخفف Tris لمجموعة السيطرة المكون من: Tris بتركيز 2.42 غم/100 مل و Citric Acid بتركيز 1.34 غم/100 مل و Fructose بتركيز 1غم/100 مل و Distill Water 73.6 مل و Glycerol 6.4 مل و Egg Yolk 20 مل و Gentamicine 0.4 مل و Tylosin 0.08 مل، وتم الاستعاضة لبقية المعاملات البروتينات دهنية واطئة الكثافة وبتراكيز مختلفة اذ بلغت 8 و 10 و 12 % بعد جمع السائل المنوي وتخفيفة، تؤخذ العينة بحافظة خاصة لمنع التأثيرات الجوية (الحراره والضوء) ووضعت العينة في البراد وتم الانتظار لحين وصوله الى 5 مْ حيث تمت تعبئته آليا في قصبات 0.25 ml France straw (IMV France) ومن ثم وضعه في رفوف خاصة وتركه لمدة تعادل 1.5 – 2 ساعه عند درجة حراره 5 مْ، بعدها نقل القساطر الى حوض الناتروجين السائل وتوضع على مشبك معدني ذو أرتفاع –4 2 سم وتركه لمدة 9 دقائق في بخار الناتروجين (–120مْ)، ثم غمره في سائل الناتروجين (–196 مْ).

الصفات التي تم دراستها

الحركة الفردية:

تم تقدير الحركة الفردية على وفق ما جاء به (12) وذلك بوضع قطرة من السائل المنوي على شريحة زجاجية مع قطرة صغيرة من سترات الصوديوم بتركيز2.9% ومن ثم وضع غطاء من شريحة (Cover Slid) تحت المجهر الضوئي ويفحص بقوة تكبير 400x وحسبت الحركة الفردية على نسبة النطف المتحركة حركة تقدمية أمامية.

فحص سلامة الاكروسوم:

تم تحضير صبغة الكيمزا حسب الطريقة التي وصفها (13) وذلك بمزج 3.8 غم من مسحوق الكيمزا و375 مل من الميثانول اضافة الى 125 مل من الكليسرول وتوضع في درجة حرارة 70مْ وتركت لمدة اسبوعين لغرض التخمير ثم تم ترشيحها وأخذ منها 3 مل ومزجت مع 2 مل من محلول الفوسفات (Sorenson buffer) الذي تم تحضيره من المواد الاتية:

المحلول الاول: تم اذابة 21.297 غم من Na_2Hpo_4 في لتر من الماء المقطر الخالي من CO_2 .

المحلول الثاني: تم اذابة 20.415 غم من $KH_2PO_4.H_2O$ في لتر من الماء المقطر الخالي من CO_2. بعدها تم اخذ 61.1 مل من المحلول الاول و 38.7 مل من المحلول الثاني وتعديل الاس الهايدروجيني للخليط باستخدام حامض HCL المخفف(N 0.1) ليصبح 6.9 ومن ثم مزج 3 مل من الصبغة مع 2 مل من محلول الفوسفات و اضافة 35 مل من الماء المقطر الخالي من CO2 لتكوين حمام الصبغة اما عملية التصبيغ فكانت تتم حسب الخطوات الاتية:

1– تم أخذ قطرة من عينة السائل المنوي لعمل مسحة على شريحة زجاجية نظيفة وتجفف بالهواء الساخن لمدة 5 – 10 دقايق.

2– ثبتت المسحة لمدة 30 دقيقة في محلول Buffred formalin saline.

3- غمرت العينة بحمام الصبغة لمدة 90 دقيقة ثم غسلت بماء مقطر وجففت وفحصت العينة بالعدسة الزيتية 1000x اما طريقة التمييز فكانت تتم من خلال تلون غطاء الراس السليم باللون الازرق المائل الى البنفسجي بينما المتضرر يبقى ابيض والمتضرر جزئيا يظهر عليه اللون الابيض في الاماكن التي حصل الضرر فيه اما الاكروسوم المنتفخ فتظهر عليه فقاعات في اماكن مختلفة من الاكروسوم وخاصة المقدمة.

4– تم حساب نسبة الاكروسوم السليم من خلال عد 200 نطفة بمناطق مختلفة من الشريحه وحسبت النسبة بحسب المعادلة الاتية :

$$\text{نسبة الاكروسوم السليم \%} = \frac{\text{عدد النطف السليمة الاكروسوم}}{\text{عدد النطف الكلية(200)}} \times 100$$

سلامة الغشاء البلازمي: قدرت النسبة المئوية للنطف ذات الغشاء البلازمي السليم بحسب طريقة (14) أذا وضع 10 مايكرومول من السائل المنوي في أنبوبة اختبار ويضاف اليه محلول Hypo-osmotic solution (فركتوز 8.72 غم / لتر وسترات الصوديوم 4.74 غم/لتر) والذي بلغ ضغطة الازموزي (100ملي اوزمول/لتر)، والاس الهيدروجيني PH 8.00 ووضع في الحمام المائي لمدة 60 دقيقة وفي درجة حرارة م وفحصت العينة تحت المجهر وبقوة تكبير 400x

وتعد النطف المنتفخة والملتفة الذيل سليمة الغشاء البلازمي. تم حساب 200 نطفة في حقول مختلفة من الشريحة. وبعد ذلك حسبت النسبة المئوية للنطف السليمة الغشاء البلازمي .

نسبة النطف السليمة الغشاء = عدد النطف السليمة الغشاء / العدد الكلي للنطف(200) × 100

التحليل الأحصائي: أستعمل البرنامج الاحصائي SAS (2012).(15) في التحليل الاحصائي للمقارنة بين المخففات بعد ان تم تطبيق التصميم العشوائي الكامل(CRD)،وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار Duncan(1955) (16) متعدد الحدود.

النموذج الرياضي : $Yij = \mu + Ti + + eij$

اذ أن :

Yij : قيمة المشاهدة j العائدة للمعاملة .

μ : المتوسط العام للصفة .

Ti : تاثير المعاملة .

eij = الخطأ العشوائي الذي يتوزع توزيعاً طبيعياً بمتوسط يساوي صفر وتباين قدره $\sigma^2 e$.

النتائج والمناقشة

أوضحت نتائج الدراسة الحالية وجود تاثير معنوي ($P\leq0.05$) لاحلال LDL في مخففات السائل المنوي للمعاملات مقارنة بمجموعة السيطرة في الحركة الفردية للنطف عند الحفظ بالتبريد (5 مْ) أذ تراوحت نسبة الحركة الفردية للنطف بين 52.20 ± 2.72 و 60.02 ± 2.02 % للمعاملات مقارنة مع 43.00 ± 2.22 % لمجموعة السيطرة ، خلال مدة التبريد 5مْ (جدول 1). كما أظهرت النتائج وجود فروق معنوية ($P\leq0.05$) في نسبة الحركة الفردية بعد 48 ساعة من الحفظ بالتجميد مابين المعاملات جميعها، اذ بلغت أعلاها في المجموعة T1 (52.54 ± 2.34 %) ثم تلتها لمعاملات T2 (47.60 ± 2.74 %) وT3 (44.40 ± 2.81 %) وأخيرا مجموعة السيطرة control (36.00 ± 2.89 %) (جدول1). من جانب أخر أظهرت النتائج وجود فروق معنوية ($P\leq0.05$) في نسبة الحركة الفردية للنطف لدى ثيران الهولشتاين بعد الشهر الاول من الحفظ بالتجميد أذ تفوقت المعاملة (T1) على جميع المعاملات اذ بلغت 48.40 ± 2.24 و 43.60 ± 2.60و 37.98 ± 2.83 و 32.20 ± 2.56 % للمعاملات T1 و T2 و T3 ومجموعة السيطرة وعلى التوالي (جدول1) . وفي السياق نفسه لوحظ وجود فروق معنوية ($P\leq0.05$) في نسبة الحركة الفردية بعد الشهر الثاني من الحفظ بالتجميد أذ تفوقت جميع المعاملات مقارنة مع مجموعة السيطرة ، وبلغت أعلاها في المعاملتين T1 و T2 (46.26 ± 2.16 % و 41.27 ± 2.94 %) على التوالي، بينما سجلت معاملة T3 تفوقاً معنوياً ($P\leq0.05$) مقارنة مع مجموعة السيطرة أذ بلغت 35.00 ± 2.70 % و 29.54 ± 2.65 % للمعاملتين T3 والسيطرة على التوالي (جدول1). كما لوحظ وجود فروق معنوية ($P\leq0.05$) مابين المعاملات في نسبة الحركة الفردية للنطف بعد الشهر الثالث من الحفظ بالتجميد أذ سجلت أعلى قيمة للمعاملة LDL%8 (44.91 ± 2.12 %) وأقل قيمة في مجموعة السيطرة (27.86 ± 2.70 %) (جدول 1) . تؤدي الدهون الفوسفاتية دورا أساسيا في استقرار هيكل جزيئة LDL بسبب خاصيته كونه محباً للماء(17). أظهرت نتائج الدراسة الحالية الى حصول تفوق معنوي ($P\leq0.05$) في الحركة الفردية لنطف الثيران الهولشتاين بعد الاسالة للمخفف الذي يحتوي LDL %8 على مخفف مجموعة السيطرة الحاوي على EY%20 (control)، وقد يرجع ذلك الى إن انخفاض كفاءة مخفف صفار بيض في حفظ النطف قد يكون بسبب احتواء صفار بيض على مواد ضارة للنطف وتثبيط العملية التنفسية فيها فضلآ عن ان HDL الموجود في EY ومايحتويه من حبيبات له تأثير ضار في النطف (10 و 18). فضلاً عن كون هذه الحبيبات ضارة عند حفظ النطف أثناء التجميد (2). كما أتضح ان لاضافة LDL الى مخفف السائل المنوي التاثير الكبير في حفظ غشاء الاكروسوم للنطفة وان هذا التاثير مستمر في كل مدد حفظ السائل المنوي سواء كان بالتبريد أو التجميد، اذ تفوقت المعاملات جميعها معنويا ($P\leq0.05$) على مجموعة السيطرة في النسبة المئوية لسلامة الاكروسوم للنطف بعد التبريد 5 مْ ، و تراوحت النسبة للمعاملات جميعها مابين 69.24 ± 2.07 – 71.16 ± 2.51 % في حين بلغت لدى مجموعة السيطرة 67.60 ± 2.67 % (جدول 2). وبعد 48 ساعة من الحفظ بالتجميد أظهرت المعاملة T1 تفوق معنوي ($P\leq0.05$) لسلامة الاكروسوم للنطف (68.66 ± 2.54) اذ سجلت اعلى قيمة لها، ثم تلتها المعاملتان T2 و T3

(67.42 ± 2.38 و 67.20 ± 2.37 %) وعلى التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة التي بلغت (63.20 ± 2.45 %) (جدول 2). تفوقت جميع المعاملات بال LDL معنوياً (P≤0.05) في نسبة سلامة الاكروسوم للنطف مقارنة مع مجموعة السيطرة بعد مرور شهر وشهرين وثلاثة اشهر من الحفظ بالتجميد، اذ بلغت أعلى قيمة لها بعد مرور شهر واحد من الحفظ بالتجميد في المعاملة T1 (67.24 ± 2.50 %) ثم تليها المعاملات T2 و T3 وأخيراً معاملة السيطرة اذ بلغت (66.68 ± 2.37 و 66.62 ± 2.34 و 61.79 ± 2.75 %) على التوالي (جدول 2). في حين بلغت أعلى قيمة لها بعد مرور شهرين من الحفظ بالتجميد لدى المعاملة T1(66.32 ± 2.61 %) مقارنة مع مجموعة السيطرة (60.98 ± 2.54 %)، وفي السياق نفسه أستمر تفوق المعاملة T1 حتى بعد مرور ثلاثة اشهر أذ بلغت 65.64 ± 2.47 % (جدول 2). وكذلك الحال بالنسبة لبقية المعاملات بال LDL اذ تفوقت معنوياً على معاملة السيطرة فقد تراوحت نسبة سلامة الاكروسوم في هذه المعاملات مابين 65.36 ± 2.36 – 65.35 ± 2.45 % للمعاملات T2 و T3 مقارنة مع 60.20 ± 2.20 % لدى معاملة (السيطرة) وضمن المده نفسها (جدول 2). ان نسبة تحسن سلامة الاكروسوم للنطف ربما تعود الى دور البروتينات الدهنية الواطئة الكثافة في حدوث اندماج فعال (Active infusion) لل LDL مع اغشية النطف قبل التجميد و حمايتها ومما ادت الى زيادة مقاومة الاغشية للتدهور عن تكوين البلورات الثلجية بسبب اضافة الLDL في اغشية النطف(2) كما أشارت النتائج الى وجود فروق معنوية (P≤0.05) في النسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي للنطف لدى ثيران الهولشتاين مابين جميع المعاملات ومجموعة السيطرة بعد التبريد 5 مْ أذ بلغت أعلاها لدى المعاملة T1 (70.00 ± 2.20 %) ، بينما سجلت مجموعة السيطرة أقل قيمة لها اذ بلغت 63.60 ± 1.56 % (جدول3). وفي السياق نفسة أظهرت النتائج وجود تفوق معنوي (P≤0.05) بعد مرور 48 ساعه من الحفظ بالتجميد أذ سجلت المعاملة (LDL%8) تفوق واضح في النسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي للنطف اذ بلغت (66.68 ± 2.01 %)، ثم تلتها المعاملتان T2 و T3 (61.30± 2.46 و 59.80 ± 2.46 % على التوالي)، في حين سجلت أقل قيمة (58.64 ± 1.81 %) لدى معاملةالسيطره (جدول 3). اما بخصوص نتائج الشهر الاول من الحفظ بالتجميد فقد اتضح وجود فروق معنوية (P≤0.05) لدى المعاملة (T1) اذ استمر تفوقها على بقية المعاملات اذ بلغت 64.96 ± 1.87 % ثم تلتها المعاملات T2 و T3 التي سجلت عدم فرق معنوي مقارنة مع السيطره اذ بلغت 60.20 ± 1.38 و 57.72 ± 1.32 و 57.19 ± 2.04 % وعلى التوالي (جدول 3). بينت نتائج الشهر الثاني من الحفظ بالتجميد وجود فروق معنوية (P≤0.05) لسلامة الغشاء البلازمي للنطف، اذ تفوقت المعاملة T1 على المعاملتين T2 و T3 اذ بلغت 65.48 ± 1.88 و 58.74 ± 1.74 و 56.98 ± 1.44 % وايضا على مجموعة السيطرة (56.46 ± 2.14 %) (جدول 3)، بينما لم تظهر النتائج وجود تاثير واضح للمعاملة بال LDL بنسبة 10 و 12 % في النسبة المئوية لسلامة الغشاء البلازمي مقارنة بمجموعة السيطرة (جدول 3). أظهرت نتائج الشهر الثالث من الحفظ بالتجميد للصفة نفسها تفوق معنوي (P≤0.05) للمعاملة T1 (64.64 ± 1.98 %) لكافة المعاملات الاخرى بال LDL ولمجموعة السيطرة كذلك (جدول 3). أن تفوق سلامة الغشاء البلازمي معنوياً (p≤0.05) لدى المعاملة نفسها T1 بعد التبريد واستمر هذا التفوق بعد مرور 48 ساعة والشهر الاول، والثاني والثالث من الحفظ بالتجميد (جدول 3) وهو دليل اخر على نجاح المعاملة بالبروتينات الدهنية الواطئة الكثافة في المحافظة على شكل النطف وتقليل التاثير الضار للتجميد. أتفقت نتائج هذه الدراسة مع (11) الذين وجدوا تحسنا واضحا في سلامة الاغشية البلازمية لنطف الثيران بعد التجميد عند أستعمال مخفف يحتوي LDL8% مقارنة مع مخفف الذي يحتوي 20% صفار بيض أذ بلغت72.2±2.37 52.6±1.77، وفي الاطار نفسه أظهرت نتائج الدراسة الحالية تفوق معنوياً(P≤0.05) لدى المعاملتين T2 وT3 مقارنة مع مجموعة السيطرة لكل من سلامة الاكروسوم وسلامة الاغشية البلازمية للنطف، ربما يعود السبب الى احلال ال LDL محل صفار البيض في مخفف السائل المنوي للنطف والذي اثبت كفاءة عالية في توفير افضل حماية للنطف(19) وعمل حماية واستقرار للاغشية البلازمية من خلال منع استنزاف

وخروج الفوسفوليبد والكوليسترول (20). أشار (21) الى ان الميكانيكية الاساسية لعمل الLDL كحماية للنطف كانت تقابل البروتينات المرتبطة بالنطف ال Binding Sperm Protein(BSP) والتي ايضا تسمى Heparin-(HBPs) binding proteins والتي تتكون من ثلاثة انواع من البروتينات (BSP1,BSP3 and BSP5 proteins) (21) تفرز من الحويصلات المنوية عند القذف وتمتزج بالنطف ولها القابلية على الارتباط بالفوسفوليبد في اغشية النطف مسببة خروج الفوسفوليبد والكوليسترول منها (8)، وذكر (22) ان لهذه البروتينات ألفة وقدرة على الارتباط بالبروتينات الدهنية العالية الكثافة(HDL) مسببة الاسراع بعملية التكيف، الا انه وعند تخفيف السائل المنوي لاغراض الحفظ فان بقاء BSP على اتصال بالنطف يؤدي الى أضعافها وجعلها أكثر حساسية وعرضة لصدمة البرودة نتيجة نقص الفوسفوليبد والكوليسترول في اغشية النطف(23)، ونستنتج بان LDL يعمل بطريقتين، الاولى اقتران الاجزاء البروتينية الدهنية الواطئة الكثافة مع بروتينات BSP التي تعطي حماية للنطفة عن طريق منع بروتينات BSP بالارتباط مع النطفة وأحداث ضرر في اغشية النطفة عن طريق أزالة الدهون. الثانية، لوحظ بان الدهون المكونة LDL قد أقترنت مع أغشية النطفة والتي تحفظ الاغشية البلازمية في أثناء حفظ الحيامن وهذا ماأورده (8). ومن جهه اخرى اتفقت نتائجنا مع عدد من الدراسات في مختلف الحيوانات التي اظهرت تفوق ال LDL على صفار البيض في جميع معاملات التجربة فقد اتفقت نتائج دراستنا مع ماذكره (24) في الارانب الذي اثبت تفوق المخفف LDL%10 كما وجد (25) في الديك تفوق المخفف الذي يحتوي LDL%4 ، ربما هذا الاختلاف في التراكيز المستخدمة من LDL يبدو ان التركيز المثالي LDL مرتبط مع نوع الحيوان (26).

جدول1. الحركة الفردية للنطف(%) لدى ثيران الهولشتاين بعد مدد مختلفة من الحفظ بالتبريد والتجميد (المتوسط ± الخطأ القياسي).

المعاملة	التبريد 5 مْ	بعد 48 ساعه من الحفظ بالتجميد	بعد الشهر الأول من الحفظ بالتجميد	بعد الشهر الثاني من الحفظ بالتجميد	بعدالشهر الثالث من الحفظ بالتجميد
C	2.22 ± 43.00 d	2.89 ± 36.00 d	2.56 ±32.20 d	2.65±29.54 D	2.70±27.86 d
T1	2.02±60.02 a	2.34±52.54 a	2.24±48.40 a	2.16±46.26 A	2.12±44.91 a
T2	2.44±56.22 b	2.74±47.60 b	2.60±43.60 b	2.94±41.27 B	2.20±39.02 b
T3	2.72±52.20 c	2.81±44.40 c	2.83±37.98 c	2.70±35.00 C	2.50±33.40 c

المتوسطات التي تحمل حروف صغيرة مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا ($P\leq0.05$).

LDL8% = T1 **LDL%12 = T3**

LDL%10 = T2 **EY%20 = C**

جدول 2. سلامة الاكروسوم للنطف(%)(Acrosme antegrity) بعد مدد مختلفة من الحفظ بالتبريد والتجميد لدى ثيران الهولشتاين (المتوسط ± الخطأ القياسي).

المعاملة	التبريد 5 مْ	بعد 48 ساعه من الحفظ بالتجميد	بعد الشهر الأول من الحفظ بالتجميد	بعد الشهر الثاني من الحفظ بالتجميد	بعدالشهر الثالث من الحفظ بالتجميد
C	2.67±67.60 c	2.45±63.20 b	2.75±61.79 b	2.54±60.98 B	2.20±60.20 b
T1	2.51±71.16 a	2.54±68.66 a	2.50±67.24 a	2.61±66.32 A	2.47±65.64 a
T2	2.75±70.06 ba	2.38±67.42 a	2.37±66.68 a	2.55±66.14 A	2.36±65.36 a
T3	2.07±69.24 bc	2.37±67.20 a	2.34±66.62 a	2.28±65.88 A	2.45±65.35 a

المتوسطات التي تحمل حروف صغيرة مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا ($P\leq0.05$).

LDL8% = T1 **LDL%12 = T3**

LDL%10 = T2 **EY%20 = C**

جدول 3. سلامة الغشاء البلازمي للنطف(%) بعد مدد مختلفة من الحفظ بالتبريد والتجميد لدى ثيران الهولشتاين (المتوسط ± الخطأ القياسي).

المعاملة	التبريد 5 مْ	بعد 48 ساعه من الحفظ بالتجميد	بعد الشهر الأول من الحفظ بالتجميد	بعد الشهر الثاني من الحفظ بالتجميد	بعد الشهر الثالث من الحفظ بالتجميد
C	1.56±63.60 c	1.81±58.64 b	2.04±57.19 b	2.14±56.46 B	1.96±55.40 b
T1	2.20±70.00 a	2.01±66.68 a	1.87±64.96 a	1.88±65.48 A	1.98±64.64 a
T2	2.02±68.04 ba	2.46±61.30 b	1.38±60.20 b	1.70±58.74 B	1.73±58.04 b
T3	2.03±66.08 b	2.46±59.80 b	1.32±57.72 b	1.44±56.98 B	1.37±56.20 b

المتوسطات التي تحمل حروف صغيرة مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا ($P \leq 0.05$).

LDL8% = T1

LDL%10 = T2

LDL%12 = T3

EY%20 = C

REFERENCES

1. McBee, L. and O.J. Cotterill. 1979. Ione xchange chromatography and electrophoresis of egg yolk. J. Food Sci,44:656-660.

2.Briand–Amirat,L. D. Bencharif , D ,Moreno,A.Neira, S. Destrumelle, D. Tain-turier, 2013 .Preliminary results : the advantages of low - density lipoproteins for the cryopreservation of equine semen. Equine Vet.Sci. 33, 1068–1075.

3.Bohlooli, S.; J .Fatin Cedden,. and R.S. Sarain 2012a.The Effect of different extenders on post-thaw sperm viability, motility and membrane Integrity in cryopreserved semen of Zandi Ram. Basic. Appl. Sci. Res., 2(2):1120-1123.

4. Bag, S.; J.Anil; S. Naqvi . and P.S. Rawat . 2002. Effect of freezing temperature, at which straws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa.Mittal Anim. Reprod. Sci, 72 :175–183.

5.Nur, Z.; Z Berrin; U.Burcu; T. Serife; S.Hakan; G. O.Cansel; G. Ulgen. and D. Ibrahim. 2011. Effect of freezing rate on acrosome and chromatin integrity in ram semen Ankara Üniv Vet. Fak Derg, 58: 267-272.

6.Kemal, A. ;Ü. Cgrgti; Z. Nur ; S. Bacinoglu; S.Pabuccuoglu; Ö.B. Özdag . and S.Bgrler.2010. Effects of extender osmolarity, cooling Rate, dilution rate and glycerol addition time on post-thaw ram semen characteristics and fertilization. J. Fac. Vet. Med. .Istanbul Üniv. 36 (2): 33-46.

7. Anton, M; F. Nau,.and Y, Nys. 2006. Bioactive egg components and their potential uses .Worlds Poultry Sci. J.; 62:429-438.

8. Manjunath, P.; A. Bergeron; J .Lefebvre . and J. Fan. 2007. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. Soc. Reprod Fertil. Suppl. 65: 217-228.

9.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.

10.Amirat,L.;T.Daniel;J.Laetitia;T.Chantal;G. Olivier; L. C.Jean .and A .Marc. 2004.Bull semen in vitro fertilityafter cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl1,a commercial egg yolk extender .Theriogenology, 61 :895– 907.

11. Hu, JH, ZL .Jiang, RK .Lv, Li QW, SS. Zhang, LS .Zan, Li YK, Li X.2011. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. Cryobiology.; 62: 83–87.

12.Walton,A .1933 . Technique of artificial insemination mp. Bur. Anim. Genet.,Iiius-Edinburgh.p 56.

13.Hancock, J. L. 1946. Morphology of bull spermatozoa. Nature., 157:447.

14.Jeyendran, R. S.; Vander van, H. H.; Perez-Pelaez, M.; Crabo, B. G.and Zaneveld, L. J. D.1984. development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J. Reprod. Fertile. 70, 219- 228.

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

16.Duncan,D.B.1955.Multiple range and mul - tiple F tests. Biometrics 11:1-42.

17. Eser Akal, Alper Kocyigit, Murat Selcuk.2014. Role of low density lipoproteins in semen preservation. Kocatepe Vet J 7(1): 69-74.

18. Demianowicz, W. and J. Strezek. 1996. The effect of lipoprotein fraction of egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. Reprod.Dom. Anim. ,31:279-280.

19. Hu, J.-H.; L.-S.; Zan; X.-L; Zhao . Q.-W.Li; Z.-L.Jiang; Y.-K Li. and X Li. 2010. Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine semen, J Anim. Sci., 88:1657-1662.

20. Bergeron, A.; C.Marie; B .Yves. and M.Puttaswamy. 2004 . low - density lipop - rotein fraction from hen’s egg yolk decre ases 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.

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

22. Gwathmey, TM.; GG. Ignotz; Mueller; JL. P .Manjunath. and SS. Suarez. 2006. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. Biol Reprod,. 75: 501-507.

23. Bergeron, A.; Y. Brindle; P .Blondin. and P. Manjunath . 2007 . Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. Biol. Reprod., 77:120-126.

24.Rosato , M .P .,N.Iaffaldano, M. Di Iorio, . A . Manchisi . 2014 . Cryopreservation of rabbit semen using non -permeable cryoprotectants : Effectiveness of different concentrations of low-density lipoproteins (LDL) from egg yolk versus egg yolk or sucrose. ANIREP-5091; No. of Pages 9.

25.Shahverdi.A,M.Sharafi,H.Gourabi,A.Amiri Ye -kta, V. Esmaeili,M . Sharbatoghl i,E.Janza - min,M .Hajnasrollahi,and F. Mostafayi . 2015 . Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low–density lipoprotein. Theriogenology 83 (2015) 78–85.

26.Vera Munoz, O., L.Amirat-Briand,, T. Diaz, , L.Vasquez, , E. Schmidt, S. Desh-erces and, M . Anton , D.Bencharif, D. Tainturier, 2009. Effect of semendilution to low-sperm number per dose on motility and function - alityof cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender Theriogenology71,895–900.