تقييم الفعل التآزري لإضافة فيتامين B12 والليبوبروتينات منخفضة الكثافة LDL لمحلول تمديد السائل المنوي للماعز الشامي

م. محمد شلطف* د. محمد موسى**

د. صاموئيل موسى***

الملخص

هدفت هذه الدراسة إلى تقييم الفعل التآزري لفيتامين B12 مع 8% LDL في نوعية السائل المنوي لذكور الماعز الشامي. وخصص لذلك عشرة تيوس من الماعز الشامي بعمر 1±3 سنة، لجمع السائل المنوي بمعدل مرتين أسبوعياً خلال الموسم التناسلي لعام 2017، واستعملت عدة محاليل تمديد، الأول محلول سترات الصوديوم مع 8% LDL واعتمد كمحلول شاهد محلي، وفي المحاليل الأربعة الأخرى أضيف إلى الشاهد المحلي أربعة تراكيز مختلفة من فيتامين B12 (1، 2، 3، 4، ملغ/ مل) على التوالي. قيمت حيوية وسلامة الغشاء البلازمي للنطف مجهرياً، كما استخدم جهاز تحليل السائل المنوي بمساعدة الحاسوب (CASA) لتقييم مؤشرات الحركية للنطف حاسوبياً بعد الإذابة.

أظهرت النتائج أن نسبة النطف الحية وسلامة الغشاء البلازمي في محلول التمديد الذي أضيف إليه 2 ملغ/مل فيتامين B12 كانت متفوقة معنوياً (P<0.001) مقارنة مع بقية محاليل التمديد المختبرة، حيث بلغ متوسط النطف الحية بعد الإذابة 77.07% وسلامة الغشاء البلازمي 75.67% في محلول التمديد الذي أضيف إليه 2 ملغ/مل فيتامين B12 مقابل (70.44%، 72.43%، 57.00%، 57.57%؛ 68.45%، 70.57%،

*مهندس في قسم الإنتاج الحيواني، كلية الزراعة، جامعة دمشق– سورية.

**أستاذ في قسم الجراحة والولادة، كلية الطب البيطري، جامعة حماه– سورية.

***أستاذ في قسم الإنتاج الحيواني بكلية الزراعة – جامعة دمشق – سورية.

55.80%، 54.14%)، في محاليل الشاهد المحلي، والمحاليل المحتوية على فيتامين B12 (1، 3، 4، ملغ/مل) على التوالي. وأظهرت نتائج التحليل باستخدام جهاز CASA بعد الإذابة تفوق عالي المعنوية (P<0.001) لمحلول التمديد الذي أضيف إليه 2 ملغ/مل فيتامين B12 مقارنة مع محلول الشاهد المحلي والمحاليل المحتوية على فيتامين B12 (1، 3، 4، ملغ/مل) في مؤشرات الحركية العامة MOT والحركة التقدمية PROG (74.48%، 14.00% مقابل 67.90%، 10.85%؛ 69.57%، 10.86%؛ 55.85%، 8.38%؛ 55.86%، 9.14%؛ على التوالي)، أما بالنسبة لمؤشرات سرعة النطف (VAP) و(VCL) و(VSL) فقد تفوق محلول التمديد (P<0.001) الذي أضيف إليه 2 ملغ/مل فيتامين على بقية المحاليل في هذه المؤشرات (70.11 ميكرومتر/ ثانية، 46.02 ميكرومتر/ ثانية، 141.76 ميكرومتر/ ثانية، على التوالي). يستنتج من هذه الدراسة الفعل التآزري بين فيتامين B12 مع 8%LDL في محلول التمديد والذي حسن من جودة النطف بعد التجميد والإذابة مقارنة بمحلول الشاهد المحلي وأفضل مستوى من فيتامين B12 يضاف لمحلول التمديد هو 2 ملغ/ مل.

الكلمات المفتاحية: تيوس الماعز الشامي، التجميد، LDL، فيتامين B12.

Evaluation of the act synergistically to vitamin B12 with low-density lipoprotein LDL in the extender of the semen of Shami goats

M. Shaltaf [*] **M. Moussa**[**]

S. Moussa[***]

Abstract

The aim of this study was to evaluate the act synergistically to vitamin B12 with 8% LDL in the semen quality of male shami goats. Ten shami buck aged 3±1-year-old Shami goats were allocated to collect semen twice a week during the 2017 reproductive season, Several extenders were used, The first extender was sodium citrate with 8%LDL and was adopted as a local extender. In the other four extenders, Added to Local extender four different concentrations of vitamin B12 (1, 2, 3, 4 mg/ml). The sperm viability and plasma membrane integrity were assessed microscopically. The computer-assisted semen analysis (CASA) was also used to evaluate the sperm motility indices after thawing. The results showed that the percentage of viability and plasma membrane integrity sperm in the extender added to 2 mg/ml vitamin B12 was significantly superior (0.001>P) compared with the rest of the tested extenders. The average viability sperm after thawing was 77.07% and the plasma membrane integrity 75.67 % In the extender which 2 mg/ ml vitamin B12 was added compared to 70.44%, 72.43%, 57.00%, 57.57%; 68.45%, 70.57%, 55.80%, 54.14% in local extender, and extenders containing vitamin B12 (1, 3, 4, mg/ml), respectively. In motility MOT and progressive motility PROG (74.48%, 14.00% vs. 67.90%, 10.85%; 69.57%, 10.86%; 55.85%, 8.38%; 55.86% and 9.14% respectively), For the velocity of sperm, the extender supplemented with 2 mg/ml, exceeded

[*] Eng at Dep. of Animal Production, Faculty of Agriculture, Damascus Univ – Syria.

[**] Professor in Dep of Surgery and Obstetrics، Faculty of Veterinary Medecine - Hama Univ, Syria.

[***] Professor at Dep. of Animal Production, Faculty of Agriculture, Damascus Univ – Syria.

(0.001>P) the other extenders in these indicators VAP, VCL and VSL (70.11 µm/s, 46.02 µm/s, 141.76 µm/s, respectively). It concluded that synergistic action between vitamin B12 and 8% LDL in the extender solution improved the quality of the sperm after freezing and thawing compared to the local extender, and the best concentration of vitamin B12 added to the extender was 2 mg/ml.

Keywords: Shami buck, Freezing, LDL, Vitamin B12.

المقدمة:

تعد عملية تطوير تقنيات تجميد السائل المنوي للماعز مهمة جداً للحد من الأضرار الناجمة عن عمليتي التجميد والإذابة، وانعكاس ذلك على حركة وسلامة الغشاء البلازمي والجسيم الطرفي والقدرة الإخصابية للنطف (Purdy، 2006)، يمكن التخفيف من هذه الأضرار من خلال استخدام معدل التبريد وواقي البرودة الأمثل.

إن التطورات الحديثة في تقانة تجميد السائل المنوي تتجه نحو استخدام الجزيئات الرئيسة في صفار البيض المسؤولة عن حماية النطف أثناء التجميد، وذلك للتخلص من المكونات الموجودة في صفار البيض ذات الأثر الضار للنطف. وقد بين Pace وGraham (1974) أن جزيئات (LDL) المعزولة من صفار البيض لها القدرة على حماية النطف من الآثار السلبية الناتجة عن التجميد، وأشار Watson (1976) إلى أن المكوّن الفعال في صفار البيض المسؤول عن حماية النطف أثناء التجميد هو الليبوبروتين منخفض الكثافة (LDL). وأشار Graham و Foote (1987) إلى أن LDL تحيط بالغشاء البلازمي للنطف وتؤمن لها الحماية من صدمة البرد، وأوضح Moussa وزملاؤه (2002) أن خاصية الإدمصاص adsorption والالتصاق gelation التي تتصف بها LDL تمكنها من تشكيل طبقة حول الغشاء الخلوي للنطف الأمر الذي يساهم في حمايتها من الضرر الناتج عن تشكل البلورات الجليدية أثناء التجميد. وأفاد أيضاً بأن عزل LDL من صفار البيض بدرجة نقاوة 97% قد حسن كثيرا من أداء ممددات السائل المنوي الحاوية عليه. بينت العديد من الدراسات بأن استخدام مادة واحدة من واقيات البرودة (كالغليسيرول مثلاً) في محلول التمديد لا تكفي لتوفير الحماية المناسبة للنطف من الآثار السلبية لعملية التجميد (Trimeche وزملاؤه، 1999)، كما أن لها أثراً سمياً على النطف (Katkov وزملاؤه، 1998؛ Garner، 1991)، وإن هذه السمية دفعت للبحث عن مواد لها تأثير مماثل للغليسيرول في حماية النطف من التجميد وأقل سمية منه (Bencharif وزملاؤه، 2010). استخدمت العديد

من المواد كواقيات للبرودة منها الأحماض الأمينية كواقيات للبرودة في محاليل تمديد السائل المنوي بعد الكشف عن دورها الحيوي في حماية بنية النطف من الضرر الناجم عن عملية التجميد (Chu وزملاؤه، 1974). بينت العديد من الدراسات بأن مشاركة الأحماض الأمينية مع واقيات البرودة الشائعة كالغليسيرول، صفار البيض، وLDL تلعب دوراً هاماً في حماية النطف بعد الإذابة عند الماعز (ALAhmad وزملاؤه، 2008)، والثيران (Amirat وزملاؤها، 2009).

يعزى التباين في حساسية نطف الأنواع الحيوانية للتبريد إلى الاختلافات في مكونات الغشاء البلازمي (Drobnis وزملاؤه، 1993)، نظراً لغناه بالأحماض الدهنية غير المشبعة والتي تكون عرضة لأنواع الأكسجين التفاعلي reaction oxygen species (ROS) (Halliwell وGutterridge، 1984؛ Alvarez وStorey، 1995)، الذي يؤدي إلى ضرر الغشاء البلازمي وتثبيط عملية التنفس وتسرب الأنزيمات داخل الخلايا (White، 1993)، إن الإنتاج المفرط من ROS وانخفاض مستوى الإنزيمات المضادة للأكسدة يؤدي إلى انخفاض حركة النطف وحيويتها، وكذلك زيادة في تشوه النطف من خلال بدء تفاعل سلسلة الأكسدة الضارة بالبروتينات، الليبيدات، وDNA (Aitken وBaker، 2004). أشارت العديد من الدراسات بأن إضافة مضادات الأكسدة ولاسيما سيانو كوبال أمين (فيتامين B12) إلى محاليل تجميد السائل المنوي للكباش(Ha وZhao، 2003)، وألفا توكوفيرول (فيتامين E) بتركيز 1ملغ/مل (Dalvit وزملاؤه، 2005) حسّن من نوعية النطف المذابة وبالتالي القدرة الإخصابية، يعد فيتامين B12 من الفيتامينات الذوابة في الماء والذي يعمل كمساعد إنزيمي في العديد من التفاعلات البيوكيميائية، مثل تخليق الميثيونين والتمثيل الغذائي للأحماض الأمينية (Juanchi وزملاؤه، 2000)، كما أنه نشط خلال النسخ الخلوي وتكوين DNA، أفاد Boxmeer وزملاؤه (2007) بوجود ارتباط إيجابي بين تركيز فيتامين B12 الكلي في البلازما المنوية وتركيز النطف في السائل المنوي.

أشار Watanbe وزملاؤه (2003) بأن عوز فيتامين B12 يزيد من عدد النطف المشوهة ويخفض من حركة وسرعة نطف الفئران. كما أنه يشترك مع فيتامين B1، B6 في التنظيم الحراري لجلد الصفن والحفاظ على الرغبة الجنسية ونوعية السائل المنوي والخصوبة خلال الإجهاد الحراري (EL-Darawany، 1999). وضح Asadpuor وزملاؤه (2012) بأن إضافة فيتامين B12 إلى محاليل التمديد زاد من حركة النطف وقدرتها على الحياة والنطف الطبيعية خلال الحفظ بالتبريد. أشار Hu وزملاؤه (2009) بأن السائل المنوي الممدد والمجمد بمحلول (Tris الغليسيرول وصفار البيض) المضاف إليه فيتامين B12 كان له تأثير كبير في نوعية السائل المنوي (مؤشرات حركة وسرعة النطف وسلامة الغشاء البلازمي والجسيم الطرفي) بعد الإذابة. ومع ذلك فإن الإضافة المفرطة من فيتامين B12 إلى محلول تمديد السائل المنوي يمكن أن يُحّيد من الإجهاد التأكسدي الناشئ عن التكوين المفرط لأنواع الأكسجين التفاعلي (ROS)، ولكنه أيضاً يؤدي إلى تعطيل وظائف النطف الطبيعية المرتبطة بـ ROS كحركة ومعدل تنفس النطف وتفاعل الجسيم الطرفي. لذلك لابد من تحديد تراكيز مضادات الأكسدة المناسبة للحفاظ على التوازن الطبيعي الموجود بين تشكيل الـ ROS وأنشطة الكبح.

نظراً لعدم وجود دراسات عن الدور التآزري لفيتامين B12 مع LDL في محاليل تمديد السائل المنوي عند الماعز الشامي، **هدفت هذه الدراسة** لتبيان الفعل التآزري لفيتامين B12 مع LDL 8% في محاليل تمديد السائل المنوي.

أولاً: مواد البحث وطرائقه:

-استخلاص جزيئات LDL من صفار البيض:

استخلصت جزيئات LDL من صفار البيض حسب طريقة Moussa وزملاؤه (2002) في مخبر التقانات الحيوية الحيوانية بقسم الإنتاج الحيواني– كلية الزراعة – جامعة دمشق كالآتي:

كُسِرت بيض دجاج طازج (خلال 24 ساعة على الأكثر من وضعها)، ثم فصل الصفار عن البياض (ألبومين البيض) ووضع على ورق ترشيح لإزالة أربطة المح (شرائط ألبومينية) وبقايا الألبومين الملتصقة على الغشاء المحي من خلال تدوير الصفار على ورقة الترشيح، ثم جرح الغشاء المحي بواسطة نصلة مشرط طبي معقم، وسكب الصفار في دورق على درجة حرارة +4 درجة مئوية لمنع نمو وتكاثر الجراثيم. مدد صفار البيض السابق في محلول فيزيولوجي (NaCl 0.17 M) بنسبة 1:1 (حجم : حجم) وحرّك لمدة ساعة في درجة حرارة +4 درجة مئوية على خلاط مغناطيسي لموازنة المحلول قبل التثفيل بسرعة 10000 × g لمدة 45 دقيقة في درجة حرارة +4 درجة مئوية، حيث انفصل القسم الطافي (البلازما) عن الراسب (الحبيبات). ثم ثفلت البلازما مرة ثانية لإزالة كل آثار الحبيبات وبعد ذلك مزجت البلازما مع 40 % من سلفات الأمونيوم (Sigma A: 4418) حتى الإشباع (مكافئ إلى 20,5 غ لكل 100 مل من البلازما) لترسيب بروتينات الليفيتين Livetins. وعدلت درجة الحموضة pH وضبطت خلال فترة الاستخلاص. بعد ساعة واحدة من التحريك في درجة حرارة +4 درجة مئوية، تم تثفيل المزيج على سرعة 10000 × g لمدة 45 دقيقة، واستبعد الراسب وتمت ديلزة (Dialyse) القسم الطافي بالماء المقطر لإزالة سلفات الأمونيوم باستعمال غشاء الديالیز(MCL 8 x 100 CLR) (Sigma - D: 9527)، أثناء عملية الديلزة، لوحظ الفصل في البلازما ضمن غشاء الديالیز نتيجة خروج سلفات الامونيوم عبر غشاء الديالیز، بعدها ثفل المحلول ثانية بسرعة 10000×g لمدة 45 دقيقة بدرجة حرارة +4 درجة وبعدها فصل الجزء الطافي عن الراسب والذي يكون غني باللیبوبروتينات منخفضة الكثافة LDL بدرجة نقاوة 97% والذي استخدم في تحضير محاليل التمديد المختبرة.

- **جمع السائل المنوي وتمديده:**

نفذت هذه المرحلة في مختبر التلقيح الاصطناعي ونقل الأجنة في محطة بحوث ازرع– محافظة درعا التابعة للمركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة

(ACSAD)، لعام 2017، حيث جمع السائل المنوي بواسطة المهبل الاصطناعي من عشرة طلائق تلقيح اصطناعي من الماعز الشامي بعمر 3±1 سنة وبمتوسط وزن 3±78 كغ بواقع قذفتين/ يوم/ تيس، وكررت العملية مرتين أسبوعياً طوال الموسم التناسلي وباعتبار أن الذكور المستخدمة مدروسة سابقاً ولا يوجد فرق معنوي في مواصفات سائلها المنوي، مزجت قذفات الذكور معاً في كل يوم جمع ومُدّدت بخمسة أنواع من محاليل التمديد محلية التحضير بدرجة حرارة 37سْ وبمعدل 275×10^6 نطفة/ مل، إذ حُضر محلول التمديد الأولي المكوّن من 3.52غ من سيترات الصوديوم اللامائية و0.194 ملغ من الغلوكوز المضافة إلى 100 مل من الماء المقطر منزوع الشوارد كمحلول أولي والذي استخدم في تحضير جميع محاليل تمديد السائل المنوي، إذ حُضِر محلول الشاهد من 8% LDL (وزن/حجم) و6.4% (حجم/حجم) من الغليسرول واستكمل الحجم إلى 100 مل من محلول التمديد الأولي (Menger وزملاؤه، 1989) مع المضادات الحيوية بمقدار 0.1 غ/مل من الستربتومايسين، و1000 وحدة دولية/مل من البنسلين، والذي قُسِم إلى خمسة أجزاء متساوية ووزعت على المحاليل المختبرة، الجزء الأول بقي كشاهد للتجربة، أما الأجزاء المتبقية أضيف إليها أربعة تراكيز (1، 2، 3، 4، ملغ/ مل) من فيتامين B12، عُدِلت درجة الحموضة pH لجميع المحاليل إلى 6.8 عند الضرورة باستخدام حمض كلور الماء.

- **تعبئة وتجميد السائل المنوي:**

نقلت العينات الممددة إلى حجرة التبريد على درجة حرارة +4° م وبقيت لمدة 2.5 ساعة (فترة التوازن والتبريد)، وأثناء هذه الفترة حُضر العدد المطلوب من القشات لكل محلول تمديد، ووضعت في حجرة التبريد لفترة كافية لخفض حرارتها إلى 4° م، بعد انقضاء مدة 2.5 ساعة في حجرة التبريد عُبئ السائل المنوي الممدد في قشات سعتها 0.5 $سم^3$ مصنوعة من الكلوريد بوليفينيل إنتاج شركة (I. M. V, L Aigel, France) لتغلق آلياً وهي في حجرة التبريد، ثم وضعت القشات المعبأة على حامل معدني خاص

يتسع 40 قشة، وتركت في حجرة التبريد حتى نهاية عملية التعبئة والإغلاق لبقية القشات. جمدت القشات باستخدام نظام التجميد الآلي (حاسب– منظم آلي– خزان سائل أزوتي مضغوط– حجرة تجميد)، حيث خفضت حرارة قشات السائل المنوي الممدد من 4ْم إلى – 140ْم خلال 4 دقائق في بخار الآزوت السائل. نُقلت القشات المجمدة أولياً إلى وعاء عازل من الستريوبور مملوء بالسائل الآزوتي تمت فيه عملية التجميد النهائي بدرجة حرارة – 196ْم. ثم نقلت القشات المجمدة إلى الحامل المخصص من خزانات الآزوت السائل للتخزين.

- **تحليل السائل المنوي حاسوبياً Computer Assisted Semen Analysis (CASA):**

قيمت مؤشرات حركية النطف باستخدام جهاز تحليل السائل المنوي بمساعدة الحاسوب (CASA)، حيث حللت قشات السائل المنوي المجمد من كل ممدد بمساعدة هذا النظام الموجود في مختبر التلقيح الاصطناعي ونقل الأجنة في هيئة الطاقة الذرية السورية – دمشق – سورية. أجري هذا الاختبار على مدار ثلاث أيام عمل وأذيبت ثلاثة قشات في كل يوم عمل ودمجت معاً وبعد تحضينها لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة 37سْ. أخذت 5 ميكروليتر من السائل المنوي ووضعت على طرف الساترة ضمن شريحة التحليل المدفئة بدرجة حرارة 37 سْ، وقام الجهاز بقياس عدد من المؤشرات المتعلقة بحركية وحيوية وسرعة النطف وهي الحركية Motility والحركة التقدمية (الأمامية)Progressive Motility (PROG)، ومعدل سرعة المسار VAP (Velocity Average Path, µm /sec)، والسرعة الخَطِّية المنحنية VCL (Curvilinear Line Velocity,µm/s، والسرعة الخَطِّية المستقيمة أو التقدمية VSL (Straight Line Velocity,µm/s)، وخطية المسار (LIN) الذي يعبر عن (VSL/VCL *100) والمدى الجانبي لضربات الرأس ALH (Amplitude Lateral Head Displacement, µm).

- **اختبار سلامة الغشاء البلازمي HOS-t:**

نفذ هذا الاختبار لتقييم سلامة الغشاء البلازمي وذلك بعد خلط 50 ميكروليتر من السائل المنوي بعد الإذابة مع 1 مل من محلول (سترات الصوديوم مع الفركتوز) منخفض الضغط الحلولي (100 ميلي أوزمول) وتحضينه بدرجة حرارة 37 سْ لمدة 45 دقيقة (Gracia-Lopez وزملاؤها، 1996)، فحصت 15 ميكروليتر من خليط العينة على شريحة مدفأة 37سْ ومغطاة بساترة تحت المجهر الضوئي بدرجة تكبير X400، اعتبرت النطاف السليمة تلك التي تملك ذيل ملتف بعد تعريضها للمحلول المنخفض الحلولية، تم عد 300 نطفة من كل شريحة وصنفت إلى سليمة أو غير سليمة اعتماداً على وجود التفاف في الذيل من عدمه.

- **اختبار النطف الحية (معدل البقاء على قيد الحياة) (ايوزين– نيغروسين):**

استخدم هذا الاختبار لتقدير النطف الحية بعد عملية التجميد والإذابة، إذ يتم من خلاله تحديد نسبتي النطف الحية والميتة. استخدمت صبغات تلوين قياسية (إيوزين– نيغروسين) لها القدرة على عبور الأغشية الخلوية للنطف الميتة وصباغتها باللون الأحمر الفاتح (لون الأيوزين)، بينما تتلون أرضية المحضر (الشريحة الزجاجية) بلون أزرق سماوي (نيغروسين) لتسهيل التقييم بواسطة مجهر ضوئي على درجة تكبير X400 وذلك وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل Bearden وFuquay (1992). إذ تعد النطف الملطخة باللون الوردي نطف ميتة أما التي تبقى شفافة تحت المجهر الضوئي فتعد نطف حية، وحُسبت على أساس ذلك نسبة النطف الحية في محاليل التمديد.

- **التحليل الإحصائي Statistical Analysis:**

حللت البيانات وفق التصميم العشوائي الكامل، باستخدام النموذج الخطي العامGeneral Linear Model (GLM)، واستخدم لذلك الغرض برنامج (SAS، 2008) لإجراء عمليات التحليل الإحصائي كافة، وتم حساب متوسط المربعات

الصغرىLSM، وفصل المتوسطات بين المعاملات باستخدام اختبار Duncan، واستخدم النموذج الخطي Model لتقدير تأثير المعاملات في المؤشرات المدروسة:

Model $Y_{ij}= \mu + E_i + e_{ij}$

حيث:

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

μ: المتوسط العام للمؤشر المدروس

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

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

ثانياً: النتائج والمناقشة:

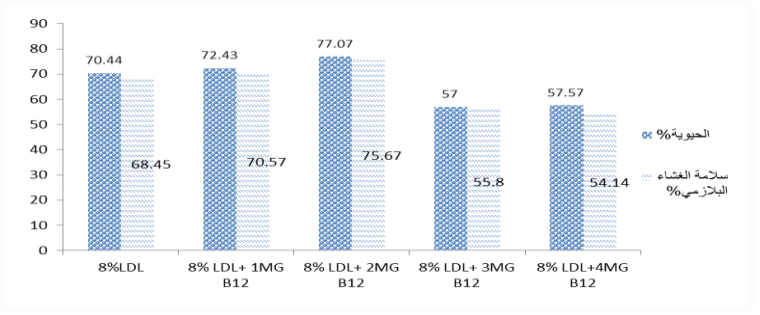
- **تقييم المؤشرات المخبرية للحيوية وسلامة الغشاء البلازمي:**

تشير نتائج الدراسة في الجدول (1) ومن خلال المقارنة بين المحاليل الاختبارية والشاهد في نسب الحيوية وسلامة الغشاء البلازمي إلى وجود فروق معنوية بين المحاليل الاختبارية، إذ لوحظ تفوق عالي المعنوية ($P<0.0001$) للمحلول الاختباري المحتوي على 2 ملغ / مل من فيتامين B12 على بقية المحاليل الاختبارية المحتوية على فيتامين B12 والشاهد في نسبتي الحيوية وسلامة الغشاء البلازمي، حيث بلغت نسبة الحيوية (70.44%، 72.43%، 77.07%، 57.00%، 57.57%) في الشاهد والمحاليل المحتوية على فيتامين B12 (1، 2، 3، 4، ملغ /مل) على التوالي، وكذلك بلغت نسبة سلامة الغشاء البلازمي (68.45 %، 70.43%، 75.67%، 55.80%، 54.14%) في المحاليل السابقة على التوالي (شكل 1).

الجدول (1): يبين تحليل التباين لتأثير الممدد على نسبة النطف الحية وسلامة الغشاء البلازمي

المؤشرات المدروسة	DF	نوع الممدد	الخطأ التجريبي	DF (للخطأ التجريبي)
الحيوية العامة (%)	**4**	(784.09)****	2.26	**41**
سلامة الغشاء البلازمي (%)		(916.013)****	2.305	54

تشير الرموز**** إلى فرق معنوي على المستوى ($P<0.0001$)



الشكل (1): النسبة المئوية لحيوية وسلامة الغشاء البلازمي للنطف بعد التجميد والإذابة

- **التقييم الحاسوبي للمؤشرات المخبرية للسائل المنوي المجمد باستخدام جهاز CASA:**

يبين الجدول (2) نتائج تحليل التباين للممددات المستخدمة وتأثيرها في مؤشرات الحركة المدروسة باستخدام جهاز التحليل الحاسوبي Computer assisted semen analysis (CASA) بعد الإذابة، والذي يؤمن معلومات دقيقة جداً حول الخصائص والمؤشرات الحركية للنطف (Sundaraman وEdwin، 2008). إن استخدام فيتامين B12 في محاليل تمديد السائل المنوي للماعز بتراكيز مختلفة (1، 2، 3، 4، ملغ/مل) في محلول8% LDL حسن من قيم مؤشرات الحركة وأدى إلى تفوق في بعض المؤشرات الحركية المدروسة مقارنة مع الشاهد المحلي (8% LDL)، وهذا يتوافق مع نتائج دراسات عديدة أوضحت دور فيتامين B12 في تحسين جودة السائل المنوي بعد الإذابة لأنواع حيوانية مختلفة كالثيران (Hu وزملاؤه، 2009)، والكباش (Hamedani وزملاؤه، 2013؛ Asadpuore وزملاؤه، 2012).

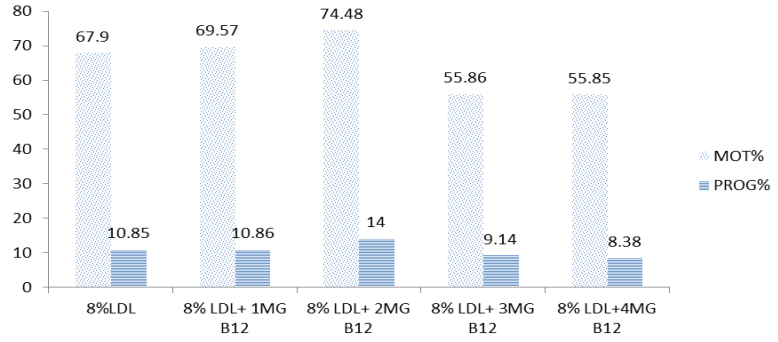
تبين نتائج الدراسة أن ممدد 8% LDL المضاف إليه 2 ملغ/ مل من فيتامين B12 تفوق بشكل معنوي ($P<0.0001$) في مؤشرات الحركة MOT (74.48%) والحركة التقدمية PROG (14.00%) مقارنة بالشاهد 8% LDL والمحاليل الاختبارية الأخرى المحتوية على فيتامين B12 (1، 3، 4، ملغ/ مل) والتي بلغت قيمها (67.90%،

69.57%، 55.85%، 55.86%؛ 10.85%، 10.86%، 9.14%، 8.38%، للحركة العامة والحركة التقدمية للمحاليل المذكورة على التوالي) (شكل 2)، وهذا ما بينته العديد من الدراسات عن مشاركة واقيات برودة أخرى في حماية النطف أثناء التجميد والإذابة كاستخدام الحمض الأميني البرولين (باشاوات وزملاؤه، 2015؛Situmorang وزملاؤه، 2001)، والحمض الأميني الغلوتامين (ALAhmad وزملاؤه، 2008؛ Trimeche وزملاؤه، 1999)، والتي لعبت دوراً تآزرياً عند إضافتها إلى محاليل تمديد السائل المنوي، وبالتالي المساهمة في تأمين حماية للنطف بعد التجميد والإذابة.

الجدول (2): جدول تحليل التباين لمؤشرات السائل المنوي المجمد بعد الإذابة بواسطة جهاز (CASA)

المؤشرات المدروسة	DF	نوع الممدد	الخطأ التجريبي	DF (للخطأ التجريبي)
النطف لمتحركة (MOT%)	4	(1064.81)****	23.83	73
النطف ذات الحركة التقدمية (PROG%)		(92.51****)	4.51	
خطية المسار (LIN%)		(13.135)	5.54	
المدى الجانبي لضربات الرأس (ALH µm)		(0.92)	0.35	
معدل سرعة المسار VAP (µm/sec)		(395.48)****	23.48	
السرعة الخطية المنحنية VCL (µm/sec)		(1669.85)****	246.62	
السرعة الخطية المستقيمة VSL (µm/sec)		(156.404)****	13.573	

تشير الرموز**** إلى فرق معنوي على المستوى (P<0.0001)



الشكل (2): يبين نسبة الحركة العامة والحركة التقدمية بعد الإذابة في محاليل التمديد المختلفة

أما بالنسبة لبقية المؤشرات الحركية كمعدل سرعة المسار (VAP) والسرعة الخطية المنحنية (VCL) والسرعة الخطية المستقيمة (VSL) لوحظ وجود فرق معنوي($P<0.0001$) بين المحلول الاختباري المحتوي على 2 ملغ/ فيتامين B12 مقارنة بالشاهد المحلي والممددات الاختبارية الأخرى المضاف إليها فيتامين B12 وبلغت قيمها (70.11ميكرومتر/ثانية، 46.02 ميكرومتر/ثانية، 141.76 ميكرومتر/ثانية، للمؤشرات السابقة الذكر على التوالي)، أظهر النتائج أيضاً عدم وجود فرق معنوي مهم ($P>0.0001$) بالنسبة لمؤشر المدى الجانبي لضربات الرأس (ALH) ولمؤشر خطية المسار (LIN) بين الشاهد 8% LDL والممددات الاختبارية المضاف إليها فيتامين B12 (جدول 3).

الجدول (3): قيم المؤشرات الحركية (سرعة النطف) بعدالإذابة في محاليل التمديد المختلفة

محاليل التمديد	VAP (µM/S)	VCL (µM/S)	VSL (µM/S)	ALH (µM)	LIN (%)
LDL8% شاهد	^{bc}63.34±1.08	^{b}121.81±3.51	^{b}41.93±0.82	^{a}7.41±0.13	^{ab}33.50±0.53
1+ %8 LDL ملغ/ B12	^{cd}60.44±1.83	^{b}121.23±5.94	^{bc}40.46±1.39	^{ab}7.24±0.22	^{a}35.00±0.89
2+ %8 LDL ملغ/ B12	^{a}70.11±0.87	^{a}141.76±2.83	^{a}46.02±0.66	^{a}7.45±0.11	^{b}32.65±0.42
3+ %8 LDL ملغ/ B12	^{bc}67.03±0.83	^{ab}130.60±5.94	^{a}45.13±1.39	^{a}7.53±0.22	^{ab}34.29±0.89
4+ %8 LDL ملغ/ B12	^{c}58.49±0.34	^{b}123.47±4.36	^{c}38.66±1.02	^{b}6.87±0.16	^{b}32.31±0.65

تشير الأحرف المختلفة ضمن العمود الواحد إلى فروق معنوية ($P<0.0001$)

تفيد بعض الأبحاث بأن هذه المؤشرات ترتبط مع القدرة الإخصابية (Vertegen وزملاؤه، 2002)، وتعتبر مفيدة للتنبؤ عن جودة السائل المنوي وقدرته الإخصابية (Krik وزملاؤه، 2005). تتفق نتائج هذه الدراسة مع أبحاث عديدة حول ضرورة استخدام الليبوبروتينات منخفضة الكثافة (LDL) والتي لها الأثر الواقي في حماية النطف من الآثار السلبية لعمليتي التجميد والإذابة نتيجة لتعرض بنية LDL للتمزق والتخريب، مما يسبب تحرر الفوسفوليبيدات والغليسريدات الثلاثية في حين يشكل الصميمات البروتينية (Apoprotein) مادة هلامية (Moussa وزملاؤه، 2002). وتشكل الفوسفوليبيدات المتحررة طبقة تقي النطف من التأثيرات الضارة لعمليتي التجميد والإذابة(Quinn وزملاؤه، 1980)، كما وتتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه Hamedani وزملاؤه (2013) وAsadapuore وزملاؤه (2012) بأن إضافة 2 ملغ/مل من فيتامين B12 لمحلول التمديد حسّن من حركة النطف وحيويتها وسلامة الغشاء البلازمي. أوضح Graham وFoote (1987) وTrimeche وزملاؤه (1996) إن الفوسفوليبيدات المتحررة من LDL تعوض الفاقد من فوسفوليبيدات الغشاء البلازمي نتيجة التجميد مما يعزز من قدرة النطف على تحمل صدمة البرد، ويقوم LDL بشكل مباشر أو غير مباشر بتقليص التعديلات التي تطرأ على بنية الغشاء البلازمي للنطف نتيجةً لعمليتي التجميد والإذابة (Moussa وزملاؤه، 2002؛ Bergeron وزملاؤه، 2004). وكذلك لفيتامين B12 دور مهم في حماية النطف وتحسين جودة السائل المنوي بعد الإذابة. صرح Hu وزملاؤه (2009) بأن السائل المنوي المجمد المضاف إليه 2.5 ملغ/مل من فيتامين B12 كان له زيادة كبيرة في نوعية السائل المنوي بعد الإذابة. أشار Cai وزملاؤه (2004) بأن فيتامين B12 استطاع أن يحسن حركة نطف الثيران خلال عمليتي التجميد والإذابة. أفاد Ha وZhao (2003) بأن محلول التمديد المضاف إليه فيتامين B المركب حَسّن من نوعية السائل المنوي بعد التجميد والإذابة. وهذا يتوافق مع دراسات عديدة بينت دور الفعل التآزري لواقيات البرودة المختلفة في

محلول التمديد (Amann وPickett، 1987) لحماية النطف عند التجميد والإذابة وتقليل الأثر السمي لواقيات البرودة (Katkov وزملاؤه، 1998)، حيث أشار Salamon وMaxwell(1995) أن مكونات محاليل تمديد السائل المنوي تؤثر في قابليته للتجميد وقدرته الإخصابية على حد سواء، وهو ما وجده بتحسن حركة النطف بعد التجميد والإذابة باستخدام محلول تمديد يحتوي 8% LDL مضافاً إليه 25 ميلي مول/مل من البرولين، وكذلك ما أشار إليه Situmorang وزملاؤه (2001) بأن إضافة البرولين زاد من قدرة محلول التمديد على حفظ السائل المنوي للثيران، كما بين Trimeche وزملاؤه (1999) بأن إضافة الغلوتامين والبرولين لمحلول التمديد كان له تأثير إيجابي في مؤشرات السائل المنوي المجمد عند الخيول، وأثبت باشاوات وزملاؤه (2015) بأن البرولين له تأثير واقي للبرودة في محلول تمديد يحتوي 8% LDL والغليسيرول، أو مع الغلوتامين (ALAhmad وزملاؤه، 2008) والذي يلعب دوراً تآزرياً عند استخدامه مع LDL في محاليل تمديد السائل المنوي للمعز، وبالتالي المساهمة في حماية النطف عند التجميد والإذابة.

تعد زيادة الحساسية لأنواع الأكسجين التفاعلي (ROS) واحدة من التغيرات الضرورية للحفاظ على النطف (Sikka، 1996). إذ يؤدي الإجهاد التأكسدي إلى تقليل مستويات ATP داخل الخلايا مما يقلل من حركة النطف ويبدأ ضرر بيروكسيد الهيدروجين على الغشاء البلازمي للنطف الغني بالأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة (Verma وKanwar، 1998). ارتبطت هذه التغيرات مع زيادة نفاذية الغشاء وتعطيل الإنزيمات وإنتاج مواد نهائية قاتلة للنطف (Hamedani وزملاؤه، 2013). إذ يؤدي أكسدة دهون الغشاء إلى تفاعل غير طبيعي للجسيم الطرفي وفقدان ميوعة الغشاء والقدرة الإخصابية (Verma وKanwar، 1998).

إذ أن فيتامين B12 يقلل من كمية ROS المتشكل الناتج عن الإجهاد التأكسدي في السائل المنوي (Chen وزملاؤه، 2001 a،b). بَيّن Hamedani وزملاؤه (2013) بأن

فيتامين B12 وّفر حماية النطف من العيوب المورفولوجية عن طريق منع الجذور الحرة للأكسجين من ضرر النطف ولعب دور واقي، وبالتالي الحفاظ على النشاط الأيضي والحيوية الخلوية للسائل المنوي للكباش، وبالتالي خفض الأثار الضارة للحفظ بالتبريد وتحسين نوعية السائل المنوي قبل وبعد التجميد.

أشار Ha وZhao (2003) بأن إنبعاث الغلوتاميك أوكزالو أسيتيك ترانسيمناز (GOT) في البلازما المنوية للكباش انخفض بشكل ملحوظ عندما أضيف فيتامين B12 إلى محلول تمديد السائل المنوي. وقد يكون عاملاً مهماً في تحسين حركة النطف خلال الحفظ بالتبريد. صرح Neild وزملاؤه (2003) بأن GOT يتحرر من البلازما المنوية خلال عمليتي التبريد والتجميد والذي يؤدي إلى ضرر الجسيم الطرفي للنطف، وبالتالي فإن إضافة B12 إلى محاليل التمديد يمنع توليد الأشكال النشطة من الاوكسجين التي تعمل على أكسدة الدهون وبالتالي يكسح ROS، وانخفضت الآثار الضارة للحفظ بالبرودة وتحسّنت نسبة سلامة الغشاء البلازمي والجسيم الطرفي للنطف بعد الإذابة (Hu وزملاؤه، 2011). أفاد Yufan (1998) بأن إضافة B12 إلى محلول التمديد للسائل المنوي للثيران قد أدى إلى تحسن في نشاط النطف، وانخفض معدل النطف المشوهة ونشاط GOT بشكل ملحوظ، تبين أن إضافة فيتامين B12 يمكن أن يحمي النطف من الأضرار الهيكلية خلال عملية التجميد (Hamedani وزملاؤه، 2013). أظهرت نتائج الدراسة بأن الزيادة المفرطة لفيتامين B12 لا يحسن من حركة نطف الماعز بعد الإذابة، وهذا ما توصل إليه Hu وزملاؤه (2011) بأن استخدام تراكيز مرتفعة من فيتامين B12 (3.75 ملغ /مل) يمارس تأثيرات سمية على نطف الثيران، إذ أن الإضافة المفرطة من فيتامين B12 يمكن أن يُحّيد الإجهاد التأكسدي الناجم عن تشكيل ROS المفرط، لكنه أيضاً قد يؤدي إلى إيقاف الوظائف الحيوية الطبيعية المرتبطة بـ ROS.

أظهرت نتائجنا وجود فعل تآزري لجزيئات LDL مع فيتامين B12 في محلول تمديد السائل المنوي للماعز وذلك من خلال دور كل منهما في حماية الغشاء البلازمي للنطف، إذ يقوم الـ LDL بحماية الغشاء البلازمي من الأثار الضارة لعملية التجميد من خلال التعديل في الروابط السطحية لـ LDL بين الصميمات البروتينية والفوسفوليبيدات وتحرر الصميمات البروتينية التي تتجمع وتشكل مادة هلامية gel (Kurisaki وزملاؤه، 1981) تحيط بالغشاء البلازمي للنطفة وتحميها بذلك من أضرار البللورات الجليدية، كما ترتبط الفوسفوليبيدات بالغشاء البلازمي للنطف فتؤمن بذلك استقرار الغشاء البلازمي وتحافظ على بنيته من التخريب (Quinn وزملاؤه، 1980؛ Ricker وزملاؤه، 2006)، أو تعويض ما فقد من الفوسفوليبيدات الغشاء البلازمي (Beregeron وManjunath، 2006). كما يقوم فيتامين B12 بحماية النطف من أضرار إجهاد الأكسدة التي تنشط أثناء عمليتي التبريد والتجميد، إذ يؤدي الإجهاد التأكسدي إلى تقليل مستويات ATP داخل الخلايا مما يقلل من حركة النطف ويبدأ ضرر بيروكسيد الهيدروجين على الغشاء البلازمي للنطف الغني بالأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة (Verma وKanwar، 1998)، والتي تكون عرضة للأكسدة نتيجة تراكم أنواع الأكسجين التفاعلي ROS، إذ يؤدي أكسدة دهون الغشاء إلى تفاعل غير طبيعي للجسيم الطرفي وفقدان ميوعة الغشاء والقدرة الإخصابية (Verma وKanwar، 1998). وبالتالي فإن إضافة B12 إلى محاليل التمديد يمنع توليد الأشكال النشطة من الاوكسجين التي تعمل على أكسدة الدهون وبالتالي يكسح ROS، مما سبق نلاحظ أن كل من LDL وفيتامين B12 يعملان في مسارين متوازين للوصول إلى هدف واحد ألا وهو حماية الغشاء البلازمي للنطف أثناء عملية التجميد.

وبالتالي فإن مشاركة 8% LDL مع فيتامين B12 كان فعال بشكل كبير في حماية النطف خلال عمليتي التجميد والإذابة. إذ تقوم LDL في حماية أغشية النطف من أضرار عملية التجميد والحفاظ على سلامتها وبدوره يقوم فيتامين B12 في الحد من

الإجهاد التأكسدي الضار الناتج عن توليد ROS وبالتالي حمايتها من أكسدة دهون الغشاء البلازمي والذي يترتب عليه خلل في ميوعة الأغشية وفقدانه دوره الحيوي.

ثالثاً: الاستنتاجات والمقترحات:

1. إن استخدام فيتامين B12 بتركيز 2ملغ/مل مع LDL في محاليل تجميد السائل المنوي لذكور الماعز الشامي يبين وجود الفعل التآزري لها في وقاية وحماية النطف من الآثار السلبية لعمليتي التجميد والإذابة.
2. يقترح استخدام السائل المنوي المجمد بمحلول (8% LDL المضاف إليه 2 ملغ /مل من فيتامين B12) في التلقيح الاصطناعي لمعرفة أثر فيتامين B12 في خصوبة إناث المعز.

المراجع References:

المراجع العربية:

1) **باشاوات، محمد عبدالوهاب. 2015**. تأثير الليبوبروتينات مُنخفضة الكثافة LDL المستخلصة من صفار البيض، والبرولين في مؤشرات السائل المنوي المُجمد وقدرته الإخصابية في أغنام العواس. أطروحة دكتوراه– جامعة دمشق، سورية.

المراجع الأجنبية:

1. **Aitken, R. J., and M. A. Baker. 2004.** Oxidative stress and male reproductive biology. Reprod. Fertil. Dev. 16:581-**588.**
2. **Al Ahmad, M. Z., G. Chatagnon, L. Amirat-Briand, M. Moussa, D. Tainturier, and M. Anton. 2008.** Use of Glutamine and Low Density Lipoproteins Isolated from Egg Yolk to Improve Buck Semen Freezing. *Reprod Domest Anim*; 43(4): 36–429
3. **Alvarez, J. G., and B. T. Storey. 1995**. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. Mol. Reprod. Dev. 42:334-346.
4. **Amann, R., and B. Pickett. 1987**. Principles of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. Equine Vet Sci ;7:145–73.
5. **Amirat, L., D. Bencharif, O. Vera-Munoz, H. BelHadj Ali ,S. Destrumelle, S. Desherces, E,Schmidt, M.Anton and D. Tainturier D. 2009.** Effect of glutamine on post-thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low-density lipoproteins) extender :preliminary results. Theriogenol., 71:1209–14.
6. **Asadpour, R., M. M. Pourseif., G. Moghadam., R. Jafari., H. Tayefi., and H. Mahmodi. 2012**. Effect of vitamin B12 addition to extenders on some physicochemical parameters of semen in crossbred rams. African Journal of Biotechnology. 11, no. 54: 11741-11745.

7. **Bearden, H. J. and J. W. Fuquay. 1992.** Applied Animal Reproduction. 3rd Ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
8. **Bencharif, D., L.Amirat, O.Pascal, M.Anton, E.Schmitt and S. Desherces. 2010.** The dvantages of combining low-density lipoproteins with glutamine for cryopreservation of canine semen. Reprod Domest Anim., 45:189 –200.
9. **Bergeron, A and P. Manjunath. 2006.** New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. Mol Reprod Dev., 73:1338-44.
10. **Bergeron, A., M. H. Crête., Y. Brindle., and P. Manjunath. 2004.** Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. Biol Reprod.;70:708-717.
11. **Boxmeer, Jolanda C., Marij Smit, Robertus F. Weber, Jan Lindemans, Johannes C. Romijn, Marinus J. Eijkemans, Nicholas S. Macklon, and Regine P. Steegers- Theunissen. 2007**. Seminal plasma cobalamin significantly correlates with sperm concentration in men undergoing IVF or ICSI procedures. Journal of andrology. 28, no. 4: 521-527.
12. **Cai, J.G., Sun, S.Q., Wang, L.G. and Gu, H.J. 2004**. The effect of adding vitamin B12 in sperm diluter on quality of bull's straw frozen sperm. J. Liaoning Agricult. Coll. 6, 10-11.
13. **Chen, Q., V. Ng, J. Mei, and S. E. Chia. 2001a**. Comparison of seminal vitamin B12, folate, reactive oxygen species and various sperm parameters between fertile and infertile males. Wei sheng yan jiu. Journal of hygiene research. 30, no. 2: 80-82.
14. **Chen, Q.X., Mei, J., Ng, V., Chia, S.E., Ling, W.H. and Ong, C.N. 2001b.** Semen folate, vitamin B12 and reactive oxygen species, and their relationships with sperm parameters. Acta Nutriment Sinica 23, 160-163.
15. **Chu, T. M., D. Aspinall and L. G. Paleg. 1974.** Stress metabolism:Part 6. Temperature stress and the accumulation of proline in barley and radish. Aust. J. Plant Physiol., 1:87-97.

16. **Dalvit, G., S. P. Llanes, A. Descalzo, M. Insani, M. Beconi, and P. Cetica. 2005.** Effect of Alpha- Tocopherol and Ascorbic Acid on Bovine Oocyte in Vitro Maturation. Reproduction in domestic animals.40, no. 2: 93-97.
17. **Drobnis, E. Z., L.M. Crowe., T. Berger., T. J. Anchordoguy., J. W Overstreet., and J. H. Crowe. 1993.** Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. J. Exp. Zool. 265, 432-437.
18. **El-Darawany, A. A. 1999.** Improving semen quality of heat stressed rams in Egypt. Indian J. Anim. Sci. 69, 1020-1023.
19. **Garcia-Lopez, Z., M. Ollero, T. Muino-Blanco and J. A. Cebrian- Perez. 1996.** A dextran swim-up procedure for separation of highly motile and viable ram spermatozoa from semen plasma. Theriogenol. 46:141-151.
20. **Garner, D. 1991.** Artificial insemination. In: Cupps PT, editor. Reproduction in domestic animals. San Diego: Academic Press. PP: 251–278.
21. **Graham, J.K and R.H. Foote. 1987.** Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. Cryobiol., 24: 42–52.
22. **Ha, F., and Zhao Y. Z. 2003**. Vitamin B Complex as a Complements in the Thawing Dilutions of the Ram Semen. J. China Herbivores. 5: 8.
23. **Halliwell, B., and J. Gutterridge. 1984.** Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. Lancet 1, 1396-1398.
24. **Hamedani, M. A., Abdol Mansour Tahmasbi, and Y. J. Ahangari. 2013.** Effects of vitamin B 12 supplementation on the quality of ovine spermatozoa. Open veterinary journal. 3, no. 2: 140-144.
25. **Hu, J.H., Q. W. LI, Y. L., Chen, Z. L. Jiang, Y. H. JIA, L. Q. Wang, and B. B. Ou. 2009**. Effects of addition of vitamin B12 to the extender on post-thaw motility, acrosome morphology, and plasma membrane integrity in bull semen. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 33, no. 5: 379-384.

26. **Hu, J- H., W. Q. Tian, X. L. Zhao, L. S. Zan, Y. P. Xin, and Q. W. Li. 2011**. The cryoprotective effects of vitamin B12 supplementation on bovine semen quality. Reproduction in domestic animals. 46, no. 1: 66-73.
27. **Juanchi, X., G. Albarran., and A. Negron-Mendoza. 2000.** Radiolysis of cyanocobalamin (vitamin B12). Radiat. Phys. Chem. 57:337-339.
28. **Katkov, I.I., N. Katkova, J.K. Crister and P. Mazur. 1998.** Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity v.s. osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. Cryobiol., 37:325–38.
29. **Kirk, E.S., E.L.Squires, and J.K.Graham. 2005**. Comparsion of in vitro laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. Theriogenology, 64: 1422-1439.
30. **Kurisaki, J.K., H. Yamauchi, H. Isshiki and S. Ogiwara. 1981.** Differences between α and β-lipovitellin from hen egg yolk. Agric Biol Chem., 45:699–704.
31. **Menger, H., G. Brückner, and L. Neubert. 1989**. In-vitro und in-vivo Untersuchungenzur Tieftemperatur Konservierung von Schafbocksperma. Arch. Exp. Vet. Med. 36:151-157.
32. **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.
33. **Neild, D. M., B. M. Gadella, M. G. Chaves, M. H. Miragaya, B. Colenbrander, and A. Agüero. 2003.** Membrane changes during different stages of a freeze–thaw protocol for equine semen cryopreservation. Theriogenology.59, no. 8: 1693-1705.
34. **Pace, M. M., and E. F. Graham. 1974.** Components in Egg Yolk which Protect Bovine Spermatozoa during Freezing1. Journal of animal science 39, no. 6: 1144-1149.
35. **Purdy, P.H. 2006**. A review on goat sperm cryopreservation. Small. Rumin. Res., 63: 215–225.
36. **Quinn, P. J., P. Y. W. Chow., and I. G. White. 1980.** Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. J. Reprod.Fertil. 60, 403–407.

37. **Ricker, J.V., J.J. Linfor, W.J. Delfino, P. Kysar, E.L. Scholtz and F. Tablin. 2006.** Equine sperm membrane phase behavior: The effects of lipid-based cryoprotectants. Biol Reprod., 74:359-65.
38. **Salamon, S and W.M.C. Maxwell. 1995.** Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Anim Reprod Sci., 37: 185-249.
39. **SAS. 2008**. User's guide statistics (Ver 9.2) SAS institute inc., cary, NC, USA.
40. **Sikka, S.C. 1996.** Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. Front. Bio sci. 1, 78-86.
41. **Situmorang, P., E. Triwulaningsih, A. Lubis, W. Caroline and T. Sugiarti. 2001.** Pengaruh Proline, Carnitine Terhadap Daya Hidup Spermatozoa Yang Disimpan Dalam Suhu 5oc (Chilling Semen). Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner., 6(1):1-6.
42. **Sundaraman, M. N., and M. N. Edwin. 2008.** Changes in motility Characteristics of Goat Spermatozoa During Glycerol-Equilibration and the Relevance to cryopreservation. Asian Journal of Cell Biology 3(1):22-33.
43. **Trimeche A, P. Renard, and D. Tainturier. 1996.** La Glutamine: un Nouveau Cryoprotecteur Pour Congeler le Sperme. Mode`le d'e´Tude: Lebaudet du Poitou. Bull AcadVe´t de France; 69:54– 447.
44. **Trimèche, A., J. M. Yvon, M. Vidament, E. Palmer and M. Magistrini. 1999.** Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. Theriogenol., 52:181-191.
45. **Verma, A. and K.C. Kanwar. 1998**. Human sperm motility and lipid peroxidation in different ascorbic acid concentrations: An in vitro analysis. Androlgia. 30, 325-329.
46. **Vertegen, J., M. Iguer-Ouada., and K. Onclin. 2002**. Computer Assisted Semen Analyzers in Andrology Research and Veterinary Practice. Theriogenology 57:149-179.

47. Watanabe, M., T. Kikawada., and T. Okuda. 2003. Increase of internal ion concentration triggers trehalose synthesis associated with cryptobiosis in larvae of Polypedilum vanderplanki. J. Exp. Biol. 206:2281-2286.

48. Watson, P.F. 1976. The protection of ram and bull spermatozoa by the low-density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5°C and deep-freezing. Thermal Biology 1, 137-141.

49. White, I. G. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. Report Fertil. Dev. 5, 639-658.

50. Yufan, L. 1998. The effects of vitamin B12 on the quality of freezing bull semen sperm. J. Hebei Normal University Sci. Technol.http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTALHBNS801.009.htm