استخراج لیپوپروتئین با چگالی کم از زرده تخم‌مرغ و مقایسه آن با لستین سویا و رقیق‌کننده تجاری آندرومد در انجمادپذیری اسپرم گاو

- **ایرج اشرفی**: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
- **حسین دقیق‌کیا***: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
- **غلامعلی مقدم**: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
- **عادل صابری‌وند**: دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت: مهر ١٣٩٥ تاریخ پذیرش: دی ١٣٩٥

چکیده

در طی فرآیند انجماد ساختارهای بیوشیمیایی و آناتومیکی سلول اسپرم تحت تاثیر قرار می‌گیرد. لذا استفاده از مواد محافظ شوک سرما در محیط انجماد، ضروری‌ترین بخش درفرآیند انجماد اسپرم می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر استفاده از سطوح مختلف لیپوپروتئین با چگالی کم (٦، ٨ و ١٠ درصد) و سطوح مختلف لستین سویا به‌عنوان ماده محافظ شوک سرما، در مقایسه با رقیق‌کننده تجاری آندرومد بر اسپرم‌های منجمد-یخ‌گشایی شده گاو هلشتاین می‌باشد. در این تحقیق از ٣ رأس گاو هلشتاین دو بار در هفته توسط واژن مصنوعی اسپرم‌گیری شد. جهت از بین بردن اثرات فردی دام‌ها، انزال‌ها به نسبت مساوی با هم مخلوط شدند. نمونه‌های رقیق‌شده منی بعد از سردسازی و پر شدن در پایوت‌ها، منجمد شده و در ازت مایع نگه‌داری شدند. نتایج بعد از یخ‌گشایی نشان داد که بین سطوح مختلف LDL و هم‌چنین سطوح مختلف لستین سویا اختلاف معنی‌داری از نظر پارامترهای ارزیابی شده وجود ندارد. استفاده از رقیق‌کننده آندرومد موجب بهبود معنی‌دار پارامترهای کنتیکی و جنبایی، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم در سطوح مختلف LDL شد (P<٠/٠٥). جنبایی پیش‌رونده در سطوح ١، ١/٥ و ٢ درصد لستین به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از آندرومد بود. اختلاف معنی‌داری در زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی سطوح مختلف لستین و رقیق‌کننده آندرومد مشاهده نشد. به‌طورکلی می‌توان رقیق‌کننده حاوی ٣ درصد لستین سویا نتایج مشابهی با رقیق‌کننده تجاری آندرومد داشت.

کلمات کلیدی: انجماد اسپرم، لیپوپروتئین با چگالی کم، لستین سویا، آندرومد، گاو هلشتاین

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: daghighkia@tabrizu.ac.ir

مقدمه

بانک‌های ذخیره اسپرم، می‌توانند همراه با دیگر تکنولوژی‌های تولیدمثلی، دربهبود نژادها و حفاظت گونه‌های وحشی و بومی درحال انقراض، نقش داشته باشند. انجماد اسپرم، امکان قرنطینه کردن آن، انتقال آن به مکان‌های دورتر، کنترل بیماری‌ها و حفظ بانک‌های ژنتیکی را ممکن ساخته (Barbas و Mascarenhas، ۲۰۰۹) و به‌طور کلی حفاظت از انجماد اسپرم همراه با سایر تکنیک‌های کمک‌کننده به تولیدمثل، کاربرد فراوانی در جهت حل مشکلات باروری حیوانات آزمایشگاهی، دامی و انسان داشته و خواهد داشت (Breitbart و Spungin، ۱۹۹۷). در مراحل حفاظت از انجماد سلول اسپرم، عوامل کلیدی زیادی نظیر ترکیب پلاسمای منی، ترکیب شیمیایی رقیق کننده‌ها، نوع و غلظت حفاظت‌کننده‌های انجمادی، دمای نگه‌داری، میزان سردسازی،دوره تعادل‌دهی، روش انجماد و یخ‌گشایی، گروه‌های واکنش اکسیژنی و کنترل بهداشت روی عمر سلول اسپرم اثر گذاشته، و جهت کسب نتایج رضایت‌بخش تعادل بین این عوامل، مهم می‌باشد (Bailey و همکاران، ۲۰۰۰).

درجریان فرآیندانجماد-ذوب،شوک‌سرمایی‌به‌شدت فسفولیپیدها و گلیکوپروتئین‌های موجود در سطح غشا را تحت تاثیر قرار داده و باعث‌شروع آسیب‌های‌ساختاری و بیوشیمیایی‌می‌شود.برای جلوگیری از این آسیب به اسپرم‌ها، علاوه بر مواد محافظ درون سلولی، به مواد محافظ خارج سلولی نیز نیاز خواهد داشت. این مواد عمدتاً لیپوپروتئین‌ها و پروتئین‌های موجود در منابعی هم‌چون زرده تخم مرغ، شیر و منابع گیاهی مثل شیره سویا و شیره نارگیل است. این مواد با عمل بر روی غشاء سلولی، اسپرم را در برابر شوک سرما محافظت می‌کند. استفاده از مواد محافظتی در غلظت‌های پایین ممکن است که برای حفاظت از اسپرم‌کافی نبوده و غلظت بالای آن‌ها نیز ممکن است که برای اسپرم سمی باشد (Salamon و Maxwell، ۱۹۹۵). اطلاعات دقیقی در خصوص مکانیسم دقیق تاثیر زرده تخم مرغ بر روی اسپرم در دسترس نمی‌باشد و فرضیه‌های متنوعی درباره این اثروجود دارد. لیپوپروتئین‌های‌باچگالی‌کم(LDLیا Low density lipoprotein) بخش تاثیرگذار زرده تخم‌مرغ به‌شمار می‌آیند که در طی فرآیند انجماد-ذوب با اتصال به غشای اسپرم باعث مقاومت اسپرم در برابر آسیب‌های‌حرارتی می‌شود (Watson، ۱۹۷۶). به‌هرحال نقش کامل پروتئین‌ها و لیپیدهای موجود در LDL در برقراری پیوند و ارتباط با غشای اسپرم هنوز به‌طورکامل مشخص نشده است. LDL حاوی مقادیری فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدل سرین است که در طی فرآیند انجماد-ذوب به‌طور مرتب جایگزین فسفولیپیدهای از دست رفته غشای اسپرم می‌شوند (Graham و Foot، ۱۹۸۷). فسفولیپیدها می‌توانند یک پرده محافظتی در اطراف غشای اسپرم تشکیل دهند. این پرده محافظتی در زمان شکسته شدن مولکول‌های LDL به‌وجود می‌آید (Trimeche و همکاران، ۱۹۹۶). جذب و ژلاتینه شدن آپوپروتئین‌های LDL در اطراف غشای اسپرم، باعث تشکیل یک غشای محافظتی در مقابل کریستال‌های یخ در اطراف غشای اسپرم شود (Moussa و همکاران، ۲۰۰۲). فرضیه دیگر این است که لیپوپروتئین‌های با چگالی کم (LDL) برای اتصال به غشای اسپرم با پپتیدهای کاتتیونیک موجود در پلاسمای منی رقابت می‌کند. این پپتیدها با وزن مولکولی کم‌تر از ۵ کیلو دالتون، با اتصال به غشای اسپرم می‌توانند باعث خارج شدن کلسترول از سطح غشا شوند (Vaupel، ۱۹۷۳). علی‌رغم اثرات بسیار مثبت زرده تخم‌مرغ برای محافظت از اسپرم، در سال‌های اخیر پژوهشگران به‌دنبال راهکاری برای حذف و یا کاهش مقدار زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده‌های منی پستانداران هستند. مهم‌ترین بخش موجود در زرده تخم‌مرغ لیپوپروتئین‌های با چگالی کم هستند. مقدار این لیپوپروتئین‌ها در زرده می‌تواند متغیر باشد و عواملی هم‌چون وراثت، تغذیه، تعداد روزهای تخم‌گذاری مرغ و شرایط نگه‌داری تخم‌مرغ مقدار آن‌ها را تحت تاثیر قرار دهد. این امر سبب شده است تا تهیه غلظت‌های استانداردی از زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده‌های انجماد منی با مشکل روبرو شود و رقیق‌کننده‌های حاوی زرده تخم‌مرغ به‌عنوان یک رقیق کننده غیراستاندارد شناخته شوند. با افزایش غلظت زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده، اگرچه درصد اسپرم‌های زنده و متحرک افزایش می‌یابد ولی‌درصداسپرم‌های‌باآکروزوم سالم کاهش می‌یابد(Fukuiو همکاران، ۲۰۰۸). ناحیه آکروزم اسپرم، مهم‌ترین بخش شرکت‌کننده اسپرم در عمل لقاح است. بنابراین اسپرم‌هایی‌که آکروزم آن‌ها آسیب دیده باشد به‌عنوان اسپرم‌های غیربارور تلقی می‌شوند (Amirat و همکاران، ۲۰۰۴). کاهش سلامت آکروزوم در اثر افزایش غلظت زرده تخم‌مرغ، در گونه‌های بز (Ritar و Salamon، ۱۹۹۱)، قوچ (Watson و Martin، ۱۹۷۵) و گاومیش (Kumar و همکاران، ۱۹۹۳) ثابت شده است. علاوه بر این زرده تخم‌مرغ به‌طور طبیعی حاوی آلودگی‌هایی است که می‌تواند از طریق رقیق‌کننده‌های منی باعث انتقال آن شود (Gil و همکاران، ۲۰۰۳). این آلودگی‌ها نه تنها قادر به انتقال یک بیماری بوده بلکه میکروارگانیزم‌های موجود در آن‌ها با تولید سمومی می‌تواند

بر روی اسپرم تاثیر گذاشته و باعث مرگ آن‌ها شوند (Bousseau و همکاران، ۱۹۹۸). Moussa و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که حضور یک‌سری مواد در زرده تخم‌مرغ می‌تواند باعث ممانعت از تنفس اسپرم شده تحرک و زنده‌مانی آن‌را کاهش دهد و این امر سبب شده است که تقاضا برای جایگزین کردن زرده بابخش موثر آن افزایش یابد. Anel و همکاران (۲۰۰۶) گزارش دادند که سویا حاوی مقدار بالایی از فسفولپیدهای شبیه زرده تخم‌مرغ است. لسیتین در حدود ۱۰ درصد از فسفولپیدهای زرده را تشکیل می‌دهد و با توجه به حضور فسفولپیدهای مشابه زرده در سویا می‌توان از آن به‌عنوان یک جایگزین گیاهی مناسب استفاده نمود (Fukui، ۲۰۰۸). استفاده از منابع جایگزین گیاهی این امکان را به‌وجود می‌آورد که حذف منابع آلودگی به‌طور کامل صورت گیرد(Bansal و Bilaspuri، ۲۰۱۱).

منابع گیاهی هم‌چون عصاره سویا دارای اثر محافظتی بهتری در مقایسه با زرده تخم‌مرغ بوده و ساختار اسپرم در این رقیق‌کننده‌ها کم‌تر تحت تاثیر صدمات ناشی از آسیب سرمایی قرار می‌گیرند (Hinsch و همکاران، ۱۹۹۷). با گذشت زمان رقیق‌کننده‌های گیاهی نیز دچار تغییراتی شده اند. این تغییرات در جهت بهبود باروری اسپرم ایجاد شده است. به‌هر حال اطلاعات دقیقی در مورد این تغییرات در دسترس‌نیست و همه آن‌ها با فرمول‌های بسته به بازار عرضه می‌شوند. یکی از این رقیق‌کننده‌ها آندرومد نام دارد که ساخت شرکت minitüb می‌باشد. بنابراین در این مطالعه سعی شده است با استخراج دقیق و استاندارد LDL از زرده تخم‌مرغ، اثرات محافظتی LDL و سطوح مختلف لستین سویا در مقایسه با رقیق‌کننده تجاری آندرومد بر خصوصیات میکروسکوپی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی‌شده گاوموردبررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

استخراج LDL از زرده تخم‌مرغ: تخم‌مرغ‌های تازه از یک گله که جیره غذایی یکسان داشتند جمع‌آوری شدند. تخم‌مرغ‌ها به‌صورت دستی شکسته شده و زرده از آلبومین جدا شد. هر یک از زرده‌ها به دقت روی کاغذ صافی غلط داده شدند تا شالاز و باقیمانده‌های آلبومین از غشای ویتلین جدا شود. سپس ویتیلن شکاف داده شده و زرده در بشری که داخل آب یخ قرار دارد جمع‌آوری شد.

جداسازی پلاسمای زرده تخم‌مرغ: ابتدا زرده با محلول ایزوتونیک سالین (۰/۱۷ مولار NACL) رقیق شده (W/W) و به‌مدت یک ساعت توسط هم‌زن مگنتی بهم زده شد. سپس به‌مدت ۴۵ دقیق با دور g×۱۰۰۰۰ در دمای c°۱۰سانتریفیوژ شد. سپس پلاسما بار دیگر به‌منظور حذف کامل گرانول‌ها سانتریفیوژ شد و پلاسما در دمای c°۴ نگه داشته شد.

استخراج LDL: پلاسما با سولفات آمونیوم ۴۰٪ مخلوط شده و به‌مدت یک ساعت به‌هم‌زده شد تا لیوتین رسوب کند. در طی این مرحله pH بر روی ۸/۷ و دما در c°۴ ثابت و تحت کنترل بود. سپس به‌مدت ۴۵ دقیقه با دور g×۱۰۰۰۰ در دمای c°۱۰سانتریفیوژ شد تا محلول رویی از رسوب جدا شود. سپس محلول رویی به‌مدت حداقل ۶ ساعت دیالیز شد تا سولفات آمونیوم کاملاً حذف شود. محلول باقی مانده دوباره طبق مراحل قبل سانتریفیوژ شده و باقی‌مانده شناور که سرشار از LDL بود جمع آوری گردید (Moussa و همکاران، ۲۰۰۲).

جمع‌آوری منی: در این تحقیق از سه رأس گاو هلشتاین (با شرایط محیطی، تغذیه‌ای و نگه‌داری یکسان) با استفاده از واژن مصنوعی دو بار در هفته اسپرم‌گیری شد. برای از بین بردن اثرات فردی دام‌های نر، به تعداد مساوی از سلول‌های اسپرم هر سه رأس دام نر در هر تکرار آزمایشی مخلوط و استفاده شدند. تمام اجزای واژن مصنوعی به‌مدت حداقل یک ساعت در دمای c°۴۰ گرم شدند. دمای داخلی واژن مصنوعی c°۴۲-۴۵ بود و هم‌چنین برای سهولت دخول آلت‌تناسلی‌دام‌نر، سطح‌داخلی‌واژن با وازلین آغشته‌شده‌بود.نمونه‌های منی جمع‌آوری شده بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و در حمام آب c°۳۴ قرار داده شدند. نمونه‌ها از نظر حجم، رنگ، عدم آلودگی به ادرار و خون، غلظت و تحرک پیش‌رونده بررسی شده و نمونه‌های منی دارای رنگ کرمی تیره، حجم بین ۱۲-۵ میلی‌لیتر، غلظت بیش‌تر از یک میلیارد اسپرم در هر یک میلی‌لیتر نمونه منی و تحرک پیش‌رونده بالاتر از ۷۰ درصد در این تحقیق استفاده شد. غلظت اسپرم به‌وسیله دستگاه فتومتر و درصد تحرک پیش‌رونده با سیستم کاسا تعیین شد (Gil و همکاران، ۲۰۰۳).

تهیه رقیق‌کننده: در این تحقیق از یک رقیق‌کننده تجاری آندرومد و هفت رقیق‌کننده بر پایه تریس که ۱۰۰ میلی‌لیتر این محلول حاوی۲/۴۲ گرم تریس، ۱/۴۸ گرم اسیدسیتریک، ۱ گرم فروکتوز، ۶/۴ میلی‌لیترگلیسرول،۵۰ میکرولیتر جنتامایسین، ۳۰ میکرولیتر لینکوپک و ۲/۵ میکرولیتر تایلوزین و درصدهای مختلف لستین سویا (سیگما، P۳۶۴۴) (۱، ۱/۵، ۲ و ۳٪) و یا درصدهای مختلف LDL (۶، ۸ و ۱۰٪) بود استفاده شد.

اعمال تیمار، سردسازی، تعادل، بسته‌بندی و انجماد: پس از ارزیابی اولیه، نمونه‌های منی با غلظت ۵۰ میلیون اسپرم در هر

میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده به فالکون‌های حاوی رقیق‌کننده‌های مختلف‌اضافه‌شده و در پایوت‌های ۰/۵میلی‌لیتر پر و بسته‌بندی شدند. پایوت‌ها روی راک چیده شده به دمای $5^{\circ}C$ منتقل شدند و پس از سپری کردن ۲ساعت زمان تعادل در این دما توسط دستگاه نیمه اتوماتیک انجماد اسپرم منجمد شده و به تانک ازت مایع (دمای $-196^{\circ}C$) انتقال یافته و تا زمان یخ‌گشایی در این دما نگه‌داری شدند (Ashrafi و همکاران، ۲۰۱۳).

ارزیابی اسپرم بعد از یخ‌گشایی-ارزیابی تحرک اسپرم: بعد از یخ‌گشایی (۴۰ ثانیه در حمام آب گرم حاوی دمای$37^{\circ}C$)، فراسنجه‌های تحرک کلی (TM)[۱]، تحرک پیش‌رونده (PM)[۲]، سرعت در مسیر منحنی (VCL)[۳]، سرعت در مسیر میانگین (VAP)[۴]، راستی مسیر طی شده (STR)[۵]، تناوب عرضی زنش (BCF)[۶]، سرعت در مسیر مستقیم (VSL)[۷]، جنبایی عرضی سر (ALH)[۸] و خطی بودن جنبایی (LIN)[۹] ارزیابی شدند. ابتدا نمونه‌ها یخ‌گشایی شده و جهت تطابق‌پذیری و بازگشت آب درون‌سلولی، به‌مدت ۵ دقیقه در دمای $37^{\circ}C$ حمام آب گرم انکوبه شدند. سپس ۵ میکرولیتر از نمونه روی لام از قبل گرم شده (در دمای $37^{\circ}C$) قرار داده و بعد از پوشش با لامل، روی صفحه گرم میکروسکوپ قرار داده شد. از هر نمونه حداقل ۱۰ فیلد به‌طور کاملاً تصادفی انتخاب و تعداد ۲۰۰ اسپرم به‌وسیله سیستم کاسا(CASA,Video TesT Sperm 3.1 Russia)بابزرگ‌نمایی ۱۰× آنالیز شد.

درصد زنده‌مانی اسپرم: این تست به‌وسیله روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین ارزیابی شد. ابتدا ۵ میکرولیتر از نمونه منی با ۵ میکرولیتر رنگ (ائوزین ۱۶/۷ گرم/لیتر آب مقطر، نیگروزین ۱۰۰ گرم/لیتر آب مقطر، بافر سیترات ۲۹ گرم/لیتر آب مقطر) روی لام به آرامی مخلوط و با لام دیگری گسترش تهیه شد. جهت خشک کردن، نمونه گسترش یافته به‌مدت سه دقیقه در دمای $37^{\circ}C$ قرار گرفت. تعداد۲۰۰ اسپرم به‌وسیله میکروسکوپ نوری و روغن ایمرسیون با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰× آنالیز شد. اسپرم‌هایی که به‌طورکلی و جزئی رنگ قرمز مایل به بنفش به خود گرفته بودند مرده و اسپرم‌هایی که رنگ به‌خودنگرفته بودند زنده محسوب شدند(Evans و Maxwell، ۱۹۸۷).

تست یکپارچگی غشای پلاسمایی (تست HOST): این تست برای بررسی یکپارچگی غشای پلاسمایی سلول اسپرم به‌کار گرفته شد. ابتدا ۵۰ میکرولیتر از نمونه منی به‌آرامی با ۵۰۰ میکرو لیتر محلول هیپواسموتیک هم‌دما (حاوی ۹ گرم/لیتر فروکتوز، ۴/۹ گرم/لیتر سیترات سدیم) مخلوط و به‌مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب گرم ($37^{\circ}C$) انکوبه شد. سپس مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه مخلوط شده و روی لام از پیش هم‌دما شده قرار گرفته و با لامل پوشانده شد. لام روی صفحه گرم میکروسکوپ فاز کنتراست قرار داده شد. تعداد ۲۰۰ اسپرم با بزرگ‌نمایی ۴۰۰× شمارش و درصد اسپرم با دم متورم و تاب خورده (طبیعی) تعیین و به‌عنوان درصد پاسخ به محلول هیپواسموتیک ثبت شد (Revell و Mrode، ۱۹۹۴).

آنالیز آماری: این مطالعه در ۵ تکرار انجام شد. داده‌های حاصل از این مطالعه در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌کمک نرم‌افزار SAS رویه GLM تجزیه وتحلیل گردید. مقایسه میانگین‌ها به‌روش دانکن انجام گرفت. سطح معنی‌داری $P<0/05$ در نظر گرفته شد. مدل آماری این طرح عبارت بود از:

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

که‌در این مدل، Y_{ij} برابراست با داده مشاهده شده برای فراسنجه‌های اندازه‌گیری شده، μ= میانگین جامعه، $Treat_i$=اثر تیمار iام برابر است با اثر تیمار و e_{ij}= اثر باقی‌مانده یا خطا بود.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها برای پارامترهای تحرک در جدول ۱ آمده است. نتایج نشان داد در مقایسه سطوح مختلف LDL با یکدیگر و هم‌چنین مقایسه سطوح مختلف لستین سویا با یکدیگر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت . استفاده از رقیق‌کننده آندرومد موجب بهبود معنی‌دار ($P<0/05$) تمامی پارامترها کنتیکی و جنبایی نسبت به سطوح مختلف LDL شد. البته اختلاف رقیق‌کننده LDL6 با آندرومد در پارامتر تناوب عرضی زنش معنی‌دار نیست. اختلاف معنی‌داری در پارامتر جنبایی کل بین رقیق‌کننده آندرومد و سطوح مختلف لستین مشاهده نشد. راستی مسیر طی شده، سرعت در مسیر

[۱]- Total Motility
[۲]-Progressive Motility
[۳]- Curvilinear velocity (micron/sec) (VCL)
[۴]- Average path velocity (micron/sec) (VAP)
[۵]- Sperm track straightness (%) (STR)
[۶]- Beat cross frequency (Hz) (BCF)
[۷]- Straight – line velocity (micron/sec) (VSL)
[۸]- Lateral head displacement (micron) (ALH)
[۹]-Linearity (%) (LIN= VSL/VCL×100)

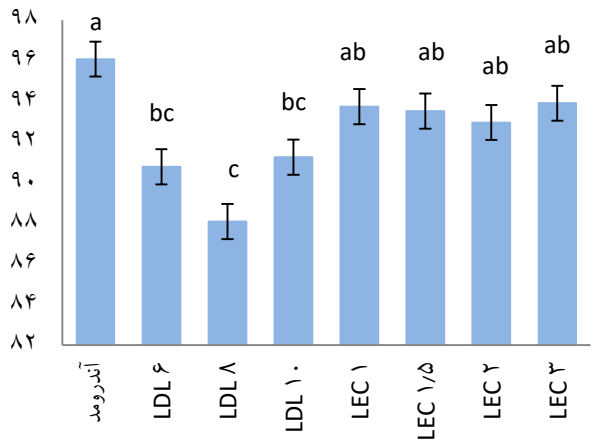
منحنی و جنبایی عرضی سر در رقیق‌کننده آندرومد به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵)بیش‌تراز سطوح مختلف لستین است. هم‌چنین پارامترهای جنبایی پیش‌رونده، سرعت در مسیر مستقیم و میانگین سرعت در مسیر رقیق‌کننده آندرومد به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) بیش‌تر از سطوح ۱، ۱/۵ و ۲ درصد لستین است ولی این اختلاف با سطح ۳٪ لستین معنی‌دار نیست. رقیق‌کننده آندرومد موجب بهبود معنی‌دار (P<۰/۰۵) درصد خطی بودن جنبایی نسبت به سطح ۲٪ لستین و تناوب عرضی زنش نسبت به سطوح ۲ و ۳٪ لستین می‌شود در حالی که این اختلاف با سایر سطوح لستین در مورد پارامترهای مذکور معنی‌دار نیست. پارامتر درصد جنبایی کل در رقیق‌کننده LDL ۸ به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از سایر گروه های تیماری است ولی اختلاف معنی‌داری بین سطوح ۶ و ۱۰ درصد LDL نسبت به سطوح مختلف لستین مشاهده نشد. با این‌که اختلاف معنی‌داری بین سطوح مختلف LDL و سطوح مختلف لستین در مورد صفات راستی مسیر طی شده، درصد خطی بودن جنبایی و تناوب عرضی زنش مشاهده نشد ولی سطوح مختلف رقیق‌کننده‌های لستین نسبت به رقیق‌کننده‌های LDL موجب بهبود معنی‌دار (P<۰/۰۵) سایر صفات کنتیکی شد.

جدول۱: مقایسه پارامترهای تحرکی و کنتیکی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده گاو توسط رقیق‌کننده آندرومد و رقیق‌کننده‌های حاوی سطوح مختلف لستین سویا و LDL

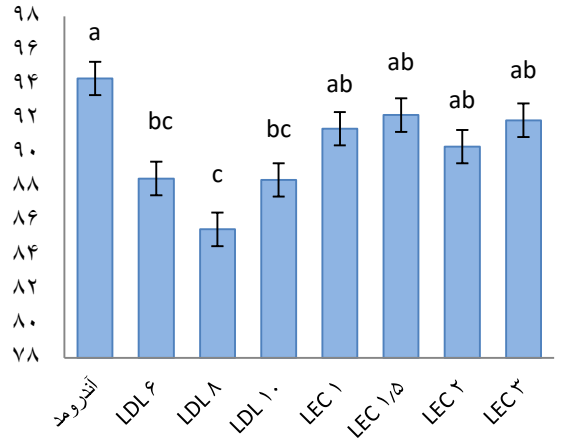
صفات	LDL ۶	LDL ۸	LDL ۱۰	لستین ۱	لستین ۱/۵	لستین ۲	لستین ۳	آندرومد
جنبایی (درصد)	۸۷/۸ ± ۳/۲^{bc}	۸۳/۱ ± ۶/۴^{c}	۸۷/۸ ± ۴/۶^{bc}	۹۱/۰ ± ۱/۸^{ab}	۹۰/۵ ± ۱/۴^{ab}	۸۹/۲ ± ۴/۰^{ab}	۹۲/۵ ± ۰/۸^{ab}	۹۳/۵ ± ۱/۴^{a}
جنبایی پیش‌رونده (درصد)	۴۸/۶±۴/۳^{c}	۴۷/۷±۳/۵^{c}	۴۹/۰±۷/۲^{c}	۵۹/۹±۲/۱^{b}	۵۸/۴±۷/۰^{b}	۵۸/۱±۲/۷^{b}	۶۱/۳±۲/۹^{ab}	۶۵/۸±۲/۸^{a}
راستی مسیر طی شده (درصد)	۰/۸۲ ± ۰/۰۳^{b}	۰/۷۹ ± ۰/۰۱^{b}	۰/۷۹ ± ۰/۰۲^{b}	۰/۸۱ ± ۰/۰۱^{b}	۰/۸۱ ± ۰/۰۲^{b}	۰/۸۱ ± ۰/۰۱^{b}	۰/۸۱ ± ۰/۰۱^{b}	۰/۸۴ ± ۰/۰۴^{a}
سرعت در مسیر منحنی (میکرون/ثانیه)	۹۰/۴ ± ۶/۰^{c}	۹۰/۹ ± ۷/۷۴^{c}	۹۴/۲ ± ۱۲/۵^{c}	۱۱۴/۱ ± ۶/۴^{b}	۱۰۹/۸ ± ۱۳/۶^{b}	۱۱۳/۵ ± ۴/۴^{b}	۱۱۶/۰ ± ۸/۰^{b}	۱۲۷/۲ ± ۶/۶^{a}
جنبایی عرضی سر (میکرون)	۱/۷ ± ۰/۰۸^{c}	۱/۷ ± ۰/۱۴^{c}	۱/۸ ± ۰/۲۱^{c}	۲/۱ ± ۰/۱۰^{b}	۲/۱ ±۰/۱۷^{b}	۲/۲ ± ۰/۱۵^{b}	۲/۲ ± ۰/۱۲^{b}	۲/۴ ± ۰/۱۸^{a}
سرعت در مسیر مستقیم (میکرون/ثانیه)	۳۹/۸ ± ۲/۹^{c}	۴۰/۹ ± ۳/۸^{c}	۴۱/۰ ± ۵/۷^{c}	۵۱/۲ ± ۵/۳^{b}	۴۸/۹ ± ۷/۲^{b}	۵۰/۵ ± ۳/۰^{b}	۵۳/۵ ± ۲/۹^{ab}	۵۸/۴ ± ۳/۲^{a}
سرعت در مسیر میانگین (میکرون/ثانیه)	۴۶/۱ ± ۳/۴^{c}	۴۷/۰ ± ۳/۷^{c}	۴۷/۴ ± ۶/۵^{c}	۵۷/۹ ± ۵/۵^{b}	۵۵/۶ ± ۷/۷^{b}	۵۷/۰ ± ۲/۹^{b}	۶۰/۳ ± ۲/۸^{ab}	۶۵/۸ ± ۳/۶^{a}
میزان خطی بودن جنبایی	۰/۴۱۳ ± ۰/۰۳^{b}	۰/۳۹۷ ±۰/۰۱^{b}	۰/۳۹۶ ±۰/۰۳^{b}	۰/۴۰۱ ± ۰/۰۲^{ab}	۰/۴۰۴ ± ۰/۰۲^{ab}	۰/۳۹۱ ± ۰/۰۱^{b}	۰/۴۱۶ ±۰/۰۲^{ab}	۰/۴۳۴ ± ۰/۰۳^{a}
تناوب عرضی زنش (هرتز)	۱۵/۵±۰/۵^{ab}	۱۵/۱±۰/۲^{b}	۱۵/۱±۰/۴^{b}	۱۵/۵±۰/۳^{ab}	۱۵/۵±۰/۹^{ab}	۱۵/۰±۰/۵^{b}	۱۵/۱±۰/۶^{b}	۱۶/۰±۰/۳^{a}

حروف غیرمشابه در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین سطوح است (P<۰/۰۵)

نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها برای پارامتر زنده‌مانی در شکل ۱ و برای پارامتر یکپارچگی غشای پلاسمایی در شکل ۲ آمده است. در مقایسه سطوح مختلف LDL با یکدیگر و هم‌چنین مقایسه سطوح مختلف لستین سویا با یکدیگر اختلاف معنی‌داری برای هر دو پارامتر مذکور مشاهده نشد. رقیق‌کننده آندرومد موجب بهبود معنی‌دار (P<۰/۰۵) هر دو پارامتر نسبت سایر رقیق‌کننده‌ها شد. هم‌چنین رقیق‌کننده LDL۸ به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی کم‌تری نسبت به سایر رقیق‌کننده‌ها را به‌همراه داشت.



شکل ۱: نمودار مقایسه درصد زنده‌مانی اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده گاو توسط رقیق کننده آندرومد و رقیق‌کننده‌های حاوی سطوح مختلف لستین سویا و LDL.



شکل ۲: نمودار مقایسه درصد یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم منجمد-یخ-گشایی شده گاو توسط رقیق‌کننده آندرومد و رقیق‌کننده‌های حاوی سطوح مختلف لستین سویا و LDL.

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین سطوح است (P<۰/۰۵)

بحث

در این مطالعه با توجه به مزیت‌های استفاده از LDL به‌جای زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده انجماد اسپرم، لیپوپروتئین‌های با چگالی کم از زرده تخم‌مرغ استخراج شده و اثرات آن در رقیق‌کننده بر پایه تریس برای انجمادپذیری اسپرم گاو مورد بررسی قرار گرفت. سطوح مختلف LDL نتایج خوبی را در ارتباط با پارامترهای جنبایی و کنتیکی، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی بعد از انجماد به‌همراه داشتند. Pace و Graham(۱۹۷۴)زرده تخم‌مرغ‌را با استفاده از اولتراسانتریفیوژ خالص‌سازی کردند و مشاهده نمودند که لیپوپروتئین‌های با چگالی کم (LDL) اثر محافظتی بر روی غشای اسپرم دارند. محققین اثر محافظتی لیپوپروتئین‌های با چگالی کم را بر روی غشای اسپرم در طی فرآیند انجماد-ذوب تایید کرده‌اند (Moussa و همکاران، ۲۰۰۲). لیپوپروتئین‌های با چگالی کم به‌خصوص بخش‌های فسفولیپیدی، قادرند با اتصال به غشای اسپرم باعث به‌تاخیر افتادن آسیب به فسفولیپیدهای غشا در موقع شوک سرمایی شده و در نتیجه باعث افزایش مقاومت آن‌ها در برابر این شوک شوند (Thun و همکاران، ۲۰۰۲). به‌هر حال نقش کامل پروتئین‌ها و لیپیدهای موجود در LDL در برقراری پیوند و ارتباط با غشای اسپرم هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است (Moussa و همکاران، ۲۰۰۲). لیپوپروتئین‌های با چگالی کم که حدود ۶۶٪ ماده جامد زرده تخم‌مرغ را تشکیل می‌دهند، در بخش محلول زرده یعنی پلاسما قرار دارند (Powrie و Nakai، ۱۹۸۶). LDLچگالی ۰/۹۸۲گرم درمیلی‌لیترداشته‌و ساختار آن کروی‌شکل باشعاع ۶۰-۱۷ نانومتراست. حدود ۸۹-۸۳٪LDLمشتمل بر تری‌گلیسرید، فسفولیپید و کلسترول بوده و مابقی آن بخش پروتئینی است (Cook و Martin، ۱۹۶۹). فسفولیپیدها به‌خصوص فسفاتیدل کولین و فسفاتیدل سرین نقش مهمی در استحکام ساختار LDL داشته و نقش محافظتی برای اسپرم ایفا می‌کنند (Graham و Foot، ۱۹۸۷). هم‌چنین جذب و ژلاتینه شدن آپوپروتئین‌های LDL در اطراف غشای اسپرم، باعث تشکیل یک غشای محافظتی در مقابل کریستال‌های یخ در اطراف غشای اسپرم می‌شود(Tsutsui،۱۹۸۸). حضور یک‌سری مواد در زرده، با ایجاد اختلال در تنفس سلولی، تحرک اسپرم را کاهش می‌دهد. استخراج بخش موثر زرده و اضافه کردن آن به رقیق‌کننده سبب حذف مواد ممانعت‌کننده تنفس سلولی می‌شود(Moussa و همکاران، ۲۰۰۲). در مطالعه‌ای که اثرات محافظتی LDL بر روی اسپرم گاو در طی دوره انجماد-ذوب، با به‌کارگیری سطوح مختلفی از LDL (۲/۵ تا ۲۰ درصد در رقیق‌کننده‌ها) بررسی شده بودنشان داد که تحرک و خصوصیات حرکتی اسپرم‌در رقیق‌کننده‌های حاوی LDL به‌طورمعنی‌داری نسبت به رقیق‌کننده تجاری تریلادیل [رقیق‌کننده تجاری بر پایه زرده تخم مرغ، گروه شاهد] بالاتر بود. اگرچه هریک از غلظت‌های LDL پاسخ‌های

متفاوتی را ایجاد کردند ولی غلظت‌های بین ۵ تا ۱۰ درصد بهترین نتایج‌در مقایسه با گروه شاهدنشان‌دادند(Moussaوهمکاران، ۲۰۰۲). Demianowicz و Strezek (۱۹۹۶) با جداسازی پلاسمای زرده تخم مرغ به دو بخش LDL و HDL (High density lipoprotein) نشان دادند که LDL محافظت بهتری را نسبت به زرده کامل برای اسپرم ایجاد می‌کند ولی HDL باعث کاهش معنی‌دار تحرک اسپرم نسبت به زرده کامل می‌شود.

در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری بین سطوح ۶، ۸ و ۱۰ درصد LDL در پارامترهای ارزیابی شده مشاهده نشد. با این وجود مطالعات گذشته گزارش کرده‌اند که افزایش غلظت LDL بیش از حد مورد نیاز باعث کاهش تحرک اسپرم می‌گردد. علت دقیق آن هنوز به‌طور کامل مشخص‌نیست، احتمالاً افزایش غلظت LDLباعث کاهش فشار اسمزی رقیق‌کننده می‌شود که با رسوب دادن فروکتوز و نمک‌های موجود این اتفاق می‌افتد. فرضیه دیگر این است که افزایش غلظت LDL تجمع و گردآمدگی آن‌ها را به دور هم افزایش داده و اثرات حفاظتی آن‌ها را کاهش می‌دهد (Moussa و همکاران، ۲۰۰۲).

لسیتین در حدود ۱۰ درصد از فسفولیپیدهای زرده را تشکیل می‌دهد و با توجه به حضور فسفولیپیدهای مشابه زرده در سویا می‌توان از آن به‌عنوان یک جایگزین گیاهی مناسب استفاده نمود. استفاده از منابع جایگزین گیاهی امکان حذف منابع آلودگی را به‌طور کامل ممکن می‌سازد (Fukui و همکاران، ۲۰۰۸). به‌همین دلیل فسفولیپیدهای سویا می‌تواند به‌عنوان یک منبع لیپیدی گیاهی جایگزینی بهتری برای زرده تخم‌مرغ و یا LDL مستخرج از زرده تخم‌مرغ باشد. با گذشت زمان رقیق‌کننده‌های تجاری گیاهی نیز دچار تغییراتی شده‌اند، به‌هر حال اطلاعات دقیقی در مورد این تغییرات در دسترس نبوده و همه آن‌ها با فرمول‌های بسته به بازار عرضه می‌شوند. آندرومد یکی از این رقیق‌کننده‌ها بوده و ساخت کشور آلمان است که تاکنون برای رقیق سازی و انجماد منی گاو (Aires و همکاران، ۲۰۰۳)، اسب (Aurich و همکاران، ۲۰۰۷)، گوسفند (Fukui و همکاران، ۲۰۰۸) و بز کوهی (Saragusty و همکاران، ۲۰۰۶) مورد استفاده قرار گرفته است. رقیق کننده آندرومدکه بر پایه بافر تریس می‌باشد حاوی لسیتین سویا، سیتریک اسید، قند و گلیسرول می‌باشد(Fukui و همکاران، ۲۰۰۸). مشخص نبودن ترکیب دقیق رقیق‌کننده‌های تجاری و هم‌چنین هزینه‌های زیاد خرید آن، ما را بر آن داشت که با طراحی این آزمایش و تعیین درصد لستین مورد نیاز در رقیق‌کننده گامی را در راستای خودکفایی ساخت رقیق کننده گیاهی انجماد اسپرم برداشته شود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد استفاده از سطوح مختلف لستین سویا (۱ الی ۳ درصد) در رقیق‌کننده انجماد اسپرم می‌تواند نتایج مشابه با رقیق‌کننده آندرومد داشته باشد. براساس مرور منابع صورت گرفته تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر مقایسه سطوح مختلف LDL و لستین سویا گزارش نشده است. نتایج‌این مطالعه نشان می‌دهد در اکثر پارامترهای ارزیابی شده سطوح لستین استفاده شده می‌تواند نتایجی حتی بهتر از LDL نیز به‌همراه داشته باشد. Gil و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که میحط انجماد تجاری بایوسفوس پلاس که حاوی عصاره سویا می‌باشد تحرک و خصوصیات حرکت اسپرم گاو را در مقایسه با محیط حاوی زرده تخم‌مرغ افزایش می‌دهد. Fukui و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده رقیق‌کننده آندرومد جهت انجماد سیمن قوچ گزارش دادند که درصد آبستنی و درصد بره‌زایی در میش‌های تلقیح شده با اسپرم منجمد شده در این رقیق‌کننده در مقایسه با رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ هیچ اختلاف معنی‌داری ندارد. رقیق کننده آندرومد که حاوی لسیتین سویا است باعث افزایش توان تحرک اسپرم و درصد آبستنی بعد از تقیح ماده گاوهای فحل می‌شود (Aires و همکاران، ۲۰۰۳).

در مطالعه حاضر تفاوت معنی داری بین سطوح ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ درصد لستین در پارامترهای ارزیابی شده مشاهده نشد. با این وجود مطالعات گذشته گزارش کرده‌اند که افزایش غلظت لستین بیش از حد مورد نیاز باعث کاهش قدرت باروری اسپرم می‌گردد که می‌تواند ناشی از افزایش ویسکوزیته و فشار اسمزی در پی استفاده از سطوح بیش‌تر لستین سویا باشد (Van و همکاران، ۲۰۰۰). در مطالعه حاضر بهترین نتایج حاصل از به‌کارگیری رقیق‌کننده آندرومد در انجماد اسپرم بود. وجود ترکیبات ناشناخته مانند انواع آنتی‌اکسیدان‌ها در ترکیب رقیق‌کننده آندرومد و هم‌چنین اسمولاریته تنظیم شده این رقیق می‌توانند از دلایل برتری آندرومد بر رقیق‌کننده‌هایی باشد که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت.

منابع

۱. **Aires, V.A.; Hinsch, K.D.; Mueller-Schloesser, F.; Bogner, K.; Mueller-Schloesser, S. and Hinsch. E., 2003.** In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. Theriogenology. Vol. 60, pp: 269-279.

۲. **Amirat, L.; Jeanneau, L.; Thorin, C.; Gerard, O.; Courtens, J.L. and Anton, M., 2004.** Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. Theriogenology. Vol. 6, pp: 895-907.

۳. **Anel, L.; Alvarez, M.; Martinez-Pastor, F.; Garcia Macias, V. and Anel, E., 2006.** Improvement strategies in ovine artificial insemination. Reprod Dom Anim. Vol. 41, pp: 30-42.

۴. **Ashrafi, I.; Kohram, H. and Farrokhi Ardabili, F., 2013.** Antioxidative effects of melatonin on kinetics,microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. Anim Reprod Sci. Vol. 139, pp: 25-30.

۵. **Aurich, C.; Seeber, P. and Muller-Schlosser, F., 2007.** Comparison of Different Extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5oc. Reprod Dom Anim. Vol. 42, pp: 445-448.

۶. **Bailey, J.L.; Bilodeau, J.F. and Cormier, N., 2000.** Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. J Androl. Vol. 21, pp: 1-7.

۷. **Bansal, A.K. and Bilaspuri, G.S., 2011.** Impacts of oxidative strees and Antioxidants one semen functions. Vet Med Int. Vol. 686137, pp: 1-7.

۸. **Barbas, J.P. and Mascarenhas, R.D., 2009.** Cryopreservation of domestic animal sperm cells. Cell Tissue Bank. Vol. 10, pp: 49-62.

۹. **Bousseau, S.; Brillard, J.P.; Guienne, M.; Guerin, B.; Camus, A. and Lechat, M., 1998.** Comparison of Bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of Bovine semen frozen in egg yolk or lecithin-based diluents. Theriogenology. Vol. 50, pp: 699-706.

۱۰. **Breitbart, H. and Spungin, B., 1997.** The biochemistry of the acrosome reaction. Mol Hum Reprod. Vol. 3, pp: 195-202.

۱۱. **Cook, W.H. and Martin, W.G., 1969.** Egg lipoproteins: in structural and functional aspects of lipoproteins in living system. Academic Press. pp: 579-615.

۱۲. **Demianowicz, W. and Strezek, J., 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. Vol. 31, pp: 279-280.

۱۳. **Evans, G. and Maxwell, W.M.C., 1987.** Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths Sydney. 194 p.

۱۴. **Fukui, Y.; Kohno, H.; Togari, T.; Hiwasa, M. and Okabe, K., 2008.** Fertility after artificial insemination using soybean based extenders in sheep. J Reprod Dev. Vol. 54, pp: 286-289.

۱۵. **Gil, J.; Januskauskas. A.; Haard, M.C.H.; Haard, M.G.M.; Johanisson, A. and Soderquist, L., 2000.** Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus and Triladyl. Reprod Dom Anim. Vol. 35, pp: 69-77.

۱۶. **Gil,J.;Rodiguez-Irazoqui,M.;Lundeheim, N.; Soderquist, L. and Rodriguez-Martinez, H., 2003.** Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination. Theriogenology. Vol. 59, pp: 1157-1170

۱۷. **Graham, J.K. and Foot, R.H., 1987.** Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. Cryobiology. Vol. 24, pp: 42-52.

۱۸. **Hinsch, E.; Hinsch, K.D.; Boehm, J.G.; Schill, W.B. and Mueller-Schloesser, F., 1997.** Functional parameters and fertilization success of bovine semen cryopreserved in egg yolk-containing extenders. Reprod Domest Anim. Vol. 32, pp:143-149.

۱۹. **Kumar, S.; Sahni, K.L. and Mohan, G., 1993.** Effect of different extender formulations on acrosomal maintenance of buffalo spermatozoa frozen in milk, Tris and sodium-citrat dilutor. Ind J Anim Sci. Vol. 63, pp:1233-1239.

۲۰. **Moussa, M.; Matinet, 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. Vol. 57, pp: 1695-1706

۲۱. **Pace, M.M. and Graham, E.F., 1974.** Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. J Anim Sci. Vol. 39, pp: 1144-1149.

۲۲. **Powrie, W.D. and Nakai S., 1986.** The chemistry of eggs and egg products. In: Stademan WJ, Cotterill OJ, the Avi Publishing Company. pp: 97-139.

۲۳. **Revell, S.G. and Mrode, R.A., 1994.** An osmotic resistance test for bovine semen. Anim Reprod Sci. Vol. 36, pp: 77-86.

۲۴. **Ritar, A.J. and Salamon, S., 1991.** Effect of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angoras goat spermatozoa. Small Rumin Res. Vol. 4, pp: 29-37.

۲۵. **Salamon, S. and Maxwell, W.M.C., 1995.** Frozen storage of ram semen: I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Anim Reprod Sci. Vol. 37, pp: 185-249

۲۶. **Saragusty, J.; Gacitua, H.; King, R. and Arav, A., 2006.** Post-mortem semen cryopreservation and characterization in two different endangered Gazelle species (*Gazelle gazelle* and *Gazelle dorcas*) and one subspecies (*gazelle acaiae*). Theriogenology. Vol. 66, pp: 775-784.

۲۷. **Thun, R.; Hurtado, M. and Jannet, F., 2002.** Comparison of Biociphoc-Plus and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. Theriogenology. Vol. 57, pp: 1087-1094

۲۸. **Trimeche, A.; Anton, M.; Renard, P.; Gandemer, G. and Tainturier, D., 1996.** Egg yolk: A novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. Cryobiolgy. Vol. 34, pp: 385-393.

۲۹. **Tsutsui, T., 1988.** Functional properties of heat-treated egg yolk low density lipoprotein. J. Food Sci. pp: 1103-1106.

۳۰. **Vaupel, H., 1973.** Tiefgefrierung von Schafbocksperma in Pelletform mit unterschieldlichen Abkiihlverfahren vor dem Einfrieren. Zuchthygiene. Vol. 8, pp: 163-170

۳۱. **Van Wagtendonk-de Leeuw, A.M.; Haring, R.M.; Kaal Lansbergen, L.M. and den Daas, J.H., 2000.** Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soybean extract. Theriogenology. Vol. 54, pp: 57-67.

۳۲. **Watson, P.F., 1976.** The protection of ram and bull spermatozoa by low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 58C and deep freezing. J Therm Biol. Vol. 1, pp: 137-141.

۳۳. **Watson, P.F. and Martin, I.C., 1975.** The influence of some fraction of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5 degrees C. Aust J Biol Sci. Vol. 238, pp: 145-152.