استخلاص البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة واستخدامها في مخففات تجميد السائل المنوي للكباش العواسي

حازم كسار جاسر الصعب* وعبد الكريم عبد الرضا هوبي
كلية الزراعة/ جامعة بغداد

الخلاصة

أُجريت هذه التجربة لغرض تحسين حيوية نطف الكباش والحد من التأثيرات الضارة للتجميد وذلك من خلال استخلاص البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة Low Density- Lipoproteins (LDL) من صفار البيض(والتي أجريت لاول مرة بالعراق) واستعمالها بدلا من صفار البيض الكامل، حيث استعملت 4 كباش من سلالة العواسي التركي، بأعمار تتراوح ما بين 2.5 –3.0 سنة، تم فيها جمع عينات السائل المنوي بواسطة المهبل الاصطناعي، ثم مزج العينات pooling وتقسيمه الى جزئين وتخفيفه بنوعين من المخففات بنسبة 1: 20. الأول مخفف الــ(Tris) مع 20% صفار البيض والثاني مخفف الــ(Tris) مع 8% بروتينات الدهنية منخفضة الكثافة (LDL)، بعد ذلك أجريت عملية تجميد السائل المنوي المخفف بالنايتروجين السائل. أُجريت عملية الإسالة وفحص الحركة الفردية للنطف وقابليتها على البقاء لأطول مدة (1، 2، 3، 4، 5 ولغاية 6 ساعات) في درجة حرارة 37م° بعد شهر وشهرين وثلاثة أشهر من إجراء عملية التجميد، ولغرض اختبار قابلية نطف الكباش المحفوظة بالتجميد بالمخففات السابقة على الإخصاب تم استخدامها بالإخصاب الخارجي أو المختبري. وأظهرت النتائج تفوق مخفف الــLDL على مخفف صفار البيض معنوياً (P<0.05) في كل من الحركة الفردية للنطف بعد التجميد إذ بلغت 51.88 ± 3.26, 33.13 ± 0.91 % للمخففين أعلاه على التوالي. ونسبة الإخصاب الخارجي للنطف بعد التجميد إذ بلغت 24.17±2.34، 14.38±2.44% على التوالي.

The extraction of Low Density Lipoprotein (LDL) and used in the diluent for the cryopreservation of Awassi ram semen

H. K. J. Al-Saab and A. A. Hubi
College of Agriculture\ University of Baghdad

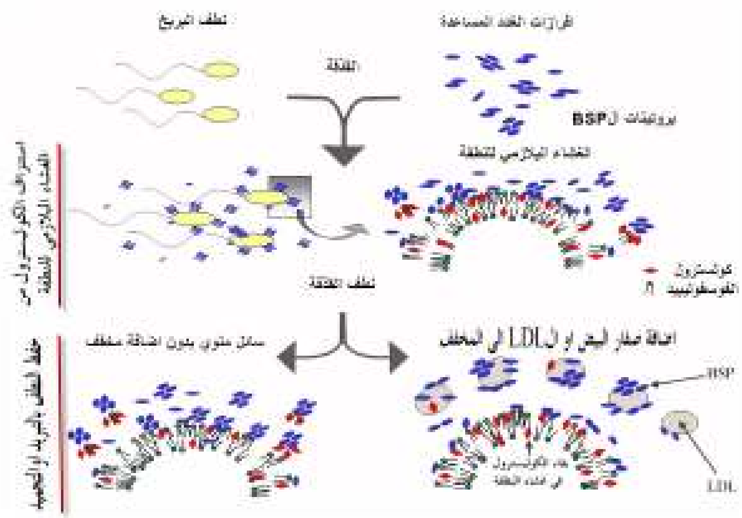
Abstract

This experiment was conducted in order to improve sperm quality. For limiting cryopreservation harmfull effect, Low Density Lipoprotein (LDL) as a good replacement for normal egg yolk was used. Semen samples was collected from four Awassi rams aged 2.5-3 years collected by the artificial vagina as 2 ejaculate/ram/week. Ejaculated ram sperm was pooling and diluted (1:20) with two deferent diluent (first: tris with 8% LDL and second: tris with 20% egg yolk), the cryopreservation of ram semen was done by the liquid nitrogen in the artificial insemination center, Thawing of the straws were done to evaluated the semen and to recorded the viability of sperm from 1- 6 hours after thawing after one, two and three months of cryopreservation. *Invitro*-fertilization (*IV*F) was used to evaluated the sperm cryopreservation. The results indicated: The viability of sperms significantly higher (p<0.05) (51.88 ± 3.26%) with semen frozen in 8% LDL extender compared to 20% egg yolk (33.13 ± 0.91) after the freeze-thaw process. The semen diluted with the extender with 8% LDL concentration Significantly (p<0.05) enhanced *invitro* fertilization after thawing.

* بحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الأول.

المقدمة

لغرض تحقيق الفوائد الكبيرة للتلقيح الاصطناعي فإن خزن النطف لمدة طويلة بواسطة التجميد يعد ضروريا وأمرا مسلما به، ولا يزال التجميد يمثل إجهاداً كبيراً للنطف إذ أن تجميد السائل المنوي يؤدي الى حصول تدهور في نوعيته (1، 2)، وعلى الرغم من التطور الحاصل في مجال تجميد السائل المنوي للثيران الا انه كان اقل نجاحاً مع الكباش (3). تؤدي عمليه تجميد السائل المنوي الى حصول انخفاض في نوعيته وغالباً ما يعود ذلك إلى التعرض لصدمه البروده (Cold shock) عند انخفاض درجه الحرارة من 15 °م إلى 4 °م فضلاً عن الأضرار الناجمة عن التجميد– استجابة النطف للانخفاض الكبير في درجة الحرارة تدعى بصدمة البرودة– وهناك تباين بين نطف الحيوانات المختلفة في مقاومتها لصدمة البرودة. وتتميز نطف الكباش بحساسيتها العالية لصدمة البرودة مقارنة مع بقية نطف حيوانات المزرعة (4). ان تعرض النطف الى صدمة البرودة سيؤدي إلى تغيرات عدة في الفعالية الايضية له ومنها الفعالية الأنزيمية. إذ إن الأضرار التي يتعرض لها الغشاء البلازمي ستؤدي إلى خروج بعض الأنزيمات وأولها Glucose-6-phosphate-dehydrogenase وسوف ينخفض ATP وتزداد نسبة (ADP/AMP)(5). وقد وجد ان هناك علاقة خطية بين حركة النطف والفعالية الإنزيمية في المايتوكوندريا (6). وبين حركه النطف وبين الخصوبة (7) فيما لم يجد (8) علاقة بين حركة النطف والخصوبة. وقد استعمل صفار البيض بشكل واسع لحماية النطف من صدمة البرودة (9) أثناء الحفظ بالتبريد والتجميد، وذلك لأنه يتكون بصورة أساسية من جزئين يمكن فصلهم بالطرد المركزي: الأول هو الجزء البلازمي ويحتوي البروتينات الدهنية واطئة الكثافة Low-density lipoproteins (LDL) (68% EY)، وبروتين Livetins (10%)، والجزء الثاني هو الراسب Granules ويحتوي البروتينات الدهنية عالية الكثافة High density- lipoproteins (HDL) (16%)، وphosvitins (4%) (10). وقد اجرى الباحثون في هذا المجال محاولات لتحديد المكونات المسؤولة عن حماية النطف الموجودة في صفار البيض، وتوصلوا إلى ان البروتينات الدهنية واطئة الكثافة Low-density lipoproteins (LDL) مكوناً اساسياً في صفار البيض والمسؤول عن الحماية التي توفر للنطف من صدمة البرودة (11)، وان آلية عمل LDL في حماية النطف موضحة في الشكل (1).



الشكل (1) ميكانيكية عمل LDL الموجود في صفار البيض لحماية الغشاء البلازمي للنطفة من استنزاف الفوسفوليبد والكوليسترول التي تسببها (BSP) (11)

المواد وطرائق العمل

- **طريقة استخلاص LDL:** تم استخلاص البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة (LDL) من صفار بيض الدجاج حسب طريقة (12) وكما يأتي:

• تم اخذ بيض دجاج طازج (24 ساعة) غير مخصب، تم تنظيف البيض وتعقيمه بـالكحول لمنع التلوث وكسر البيض والتخلص من الالبومين ووضع الصفار على ورقة ترشيح ودحرجته وكسر غشاء المح vitellin membrane بوساطة مشرط طبي معقم ثم جمع الصفار في بيكر زجاجي محاط بالثلج.

• تم فصل البلازما المحتوية على LDL حسب طريقة (13)، تم خلط صفار البيض مع محلول ملحي متساوي التوتر (NaCl 0.17M) بنسبة 2:1 (W:W) وخلطها جيدا لمدة ساعة وبدرجة حرارة 4 م°، فصلت البلازما بواسطة جهاز الطرد المركزي المبرد وبسرعة 10000xg لمدة 45 دقيقة وبدرجة حرارة 10 م°، ترك الراسب واخذ البلازما وأعيدت عملية الطرد المركزي لمرة ثانية وفي الظروف نفسها، حفظت البلازما في الثلاجة (بدرجة حرارة 4 م°).

• تم مزج البلازما مع 40% Ammonium sulfate (شركة Carlo Erba-Italy) ولمدة ساعة لترسيب Livetins على ان تتم المحافظة على pH =8.7 ودرجة حرارة 4°م، تنقل البلازما إلى جهاز الطرد المركزي وبسرعة 10000 ×g لمدة 45 دقيقة وبدرجة حرارة 10 مْ، وتؤخذ الطبقة الطافية (السائلة) وتوضع في أكياس ديلزة وتوضع في ماء مقطر لمدة 6 ساعات للتخلص من Ammonium sulfate، بعدها تجرى عملية الطرد المركزي وبسرعة 10000×g لمدة 45 دقيقة وبدرجة حرارة 10 م° ليتم الحصول على LDL وبشكل طبقة طافية على سطح السائل يتم جمعه والاحتفاظ به في الثلاجة (بدرجة حرارة 4 م°) لاستعماله خلال أسبوع.

- **جمع وتخفيف وتجميد السائل المنوي:** أجريت هذه التجربة للمدة من أيلول ولغاية تشرين ثاني/ 2011 في محطة بحوث الأغنام والماعز في منطقة عكركوف التابعة إلى الهيأة العامة للبحوث الزراعية/ وزارة الزراعة، استعمل فيها 4 كباش عواسي تركي، بأعمار تتراوح ما بين 2.5 – 3 سنة، تم جمع عينات السائل المنوي بواسطة المهبل الاصطناعي من كباش التجربة بواقع 2 قذفة/ كبش/ أسبوع وإجراء الفحوص عليها ثم مزج العينات pooling وتقسيمه إلى جزئين وتخفيفه بنوعين من المخففات بنسبة 1: 20، المخفف الأول المكون من: Tris (hydroxymethylamin methane) بتركيز 3.63غم/ 100 مل و Citric acid بتركيز 1.99غم/ 100 مل و Fructose بتركيز 0.5غم/ 100 مل و Penicilline بتركيز 100000 وحدة دولية/ 100 مل و Streptomycin بتركيز 100 ملغم/ 100 مل و20% صفار البيض، المخفف الثاني تم الاستعاضة فيه 8% LDL بدلا من صفار البيض. (التركيز النهائي للنطف= 106229.9 x نطفة/ مليلتر).

بعد جمع السائل المنوي وتخفيفه تم حفظه في وعاء عازل للحرارة أو البرودة (Thermos) ونقله إلى مركز التلقيح الاصطناعي/ أبو غريب التابع إلى الشركة العامة لخدمات الثروة الحيوانية، حيث تم تبريده إلى درجة 5م° وتعبئته آليا في قساطر French straws 0.25 مل (IMV, France) (تركيز النطف= 10^6x57.5 نطفة/ قسطرة) وتركه لمدة تعادل 2–2.5 ساعة عند درجة حرارة 5م°، بعدها نقل إلى حوض النايتروجين السائل وتركه لمدة 10 دقائق في بخار النايتروجين –75 م°، ثم غمره في سائل النتروجين (–196م°). تم فحص الحركة الفردية للنطف بعد الإسالة بـ(0، 1، 2، 3، 4، 5، 6) ساعة بعد مرور شهر وشهرين وثلاثة أشهر من التجميد.

- **الإخصاب الخارجي:** أجريت في مختبرات معهد بحوث الأجنة وعلاج العقم التابع الى جامعة النهرين في الكاظمية، للمدة من 1 آذار –15 مايس لإجراء عملية الـ*IVF*. حيث تم جمع المبايض من مجزرة الشعلة ووضعها في عبوة زجاجية تحتوي محلول ملحي فسلجي (0.9% NaCl) ، ومضادات حيوية (penicillin وبتركيز 100 وحدة دولية/ مل وStreptomycin بتركيز 0.1 مليغرام/ مل) ونقلها إلى المختبر في وعاء عازل حراري (thermos) بدرجة حرارة 30–37م° خلال 1–1.5 ساعة، وبعد نقلها إلى المختبر تم غسلها لثلاث مرات بالمحلول الفسلجي (0.9% NaCl) المدعم بالمضادات الحيوية (penicillin وبتركيز 100 وحدة دولية/ مل وStreptomycin بتركيز 0.1 مليغرام/ مل) (14). تم جمع البويضات بطريقة Oocytes aspiratioin، وتم استبعاد البويضات التالفة Atratic oocyte.

تم وضع كل 5–7 بويضات في صحن مختبري صغير خاص In vitro fertilization 4well plate (Falcon com. U.S.A) يحتوي 0.5 مل من الوسط الزرعي (RPMI-1640) وتغطيتها بطبقة من زيت البارافين (Paraffin oil) ووضعها في حاضنة Co_2 (5% CO_2) ودرجة حرارة 38.5م° ورطوبة نسبية 95% ولمدة 24 ساعة). تم اعتماد طريقة السباحة الى الاعلى لتنشيط النطف Sperm activation بعد الإسالة لغرض الإخصاب (15). تم اخذ كل 5 بويضات ناضجة في 0.5 مل من الوسط الزرعي في الصحن المختبري وأضيف لها النطف بواقع $5\ x10^4$ نطفة/ بويضة وتغطيتها بطبقة من زيت البارافين السائل ووضعها في حاضنة Co_2 (5% CO_2) ودرجة حرارة 38.5م° ورطوبة نسبية 95% ولمدة 24 ساعة).

استعمل البرنامج الإحصائي SAS (2004) (16) في التحليل الإحصائي للمقارنة بين المخففين بعد ان تم تطبيق التصميم العشوائي الكامل (CRD)، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار Duncan (1955) (17) متعدد الحدود.

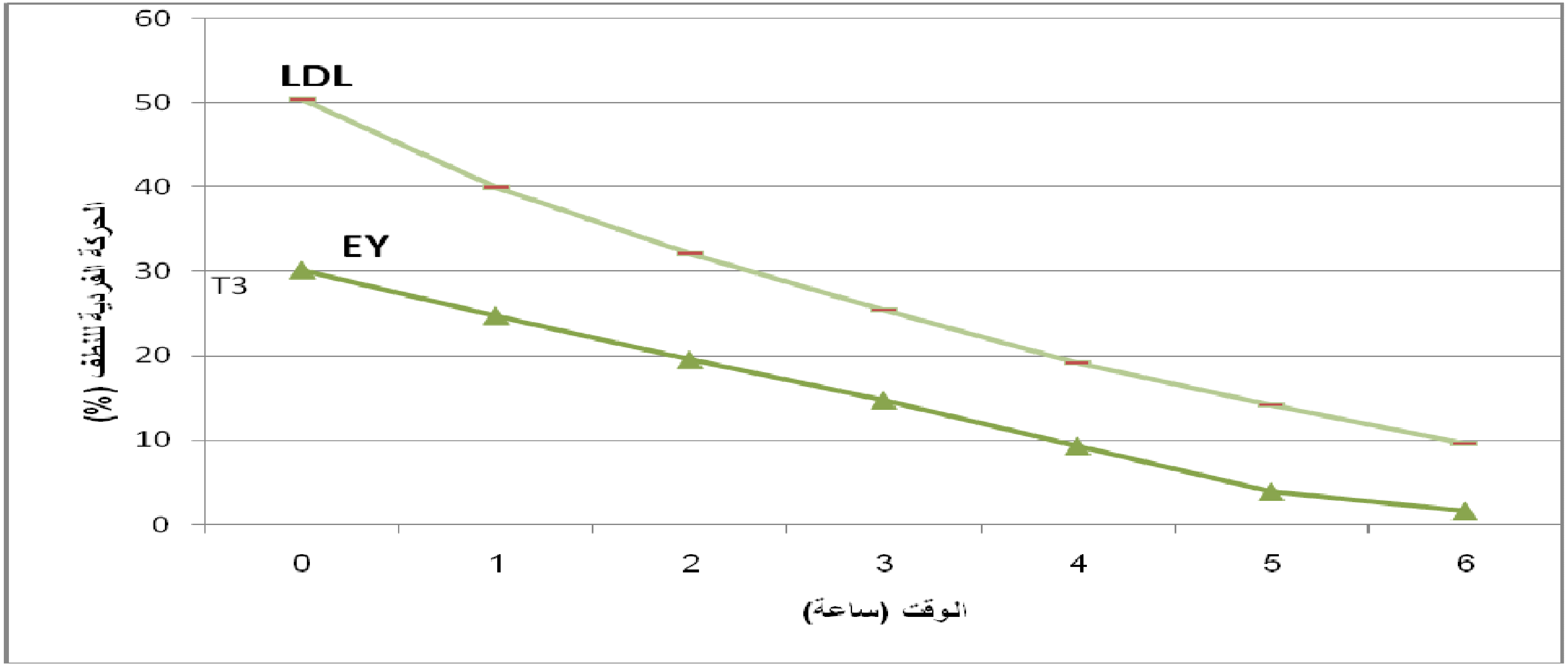
النتائج

- **تأثير إضافة LDL في الحركة الفردية للنطف بعد التجميد:** أظهرت النتائج ان استخدام LDL بدل صفار البيض في مخفف السائل المنوي للكباش كان له تأثيراً معنوياً (P<0.05) في المحافظة على الحركة الفردية للنطف بعد التجميد مقارنة بصفار البيض إذ بلغت 51.88±3.26، 33.13±0.91% بعد مرور شهر واحد و51.25±3.75، 30.00±1.34% بعد شهرين و48.13±3.89, 27.50 ± 1.89% بعد ثلاث أشهر من تجميد السائل المنوي لمخفف LDL ومخفف صفار البيض على التوالي (جدول 1). كما ان استمرار النطف بالحركة عند حضنها لمدة 6 ساعات بدرجة حرارة 37م° طول مدة الحضن كان أعلى عند استخدام LDL بدل صفار البيض في مخفف السائل المنوي (الشكل 1)، فقد بلغ معدل الحركة الفردية للنطف للأشهر الثلاثة بعد التجميد وبعد 6 ساعات من الحضن 9.58±1.50، 1.67±0.72% للمخففين أعلاه على التوالي (جدول 1).
- **تأثير إضافة LDL في نسبة الإخصاب المختبري *IVF*:** إن نسب الإخصاب المختبري للنطف المسالة بعد التجميد بلغت 24.17 ±2.34 للمجموعة المعاملة بمخفف LDL والتي تفوقت معنوياً (P<0.05) على للمجموعة المعاملة بمخفف صفار البيض والتي بلغت 14.38 ±2.44% (جدول2) .

جدول (1) تأثير إضافة LDL إلى مخفف السائل المنوي للكباش في الحركة الفردية للنطف بعد التجميد

بعد التجميد	نوع المخفف	الحركة الفردية للنطف(%) بعد الإسالة بـــ (ساعة)						
		0	1	2	3	4	5	6
شهر	مخفف الـــ LDL	^{a}3.26 ± 51.88	^{a}3.78 ± 41.88	^{a}2.95 ± 33.75	^{a}1.64 ± 27.50	^{a}1.88 ± 23.13	^{a}1.75 ± 19.38	^{a}1.83 ± 16.25
	امخفف الـــ EY	^{b}0.91 ± 33.13	^{b}0.94 ± 27.50	^{b}1.88 ± 21.88	^{b}2.06 ± 18.75	^{b}1.88 ± 13.13	^{b}1.88 ± 6.88	^{b}1.88 ± 3.13
شهرين	مخفف الـــ LDL	^{a}3.75 ± 51.25	^{a}2.58 ± 40.63	^{a}2.40 ± 30.63	^{a}2.83 ± 25.00	^{a}1.88 ± 16.88	^{a}1.88 ± 11.88	^{a}2.06 ± 6.25
	امخفف الـــ EY	^{b}1.34 ± 30.00	^{b}1.48 ± 24.38	^{b}1.13 ± 19.38	^{b}1.57 ± 13.75	^{b}1.57± 8.75	^{b}0.91 ± 3.13	^{b}0.91 ± 1.88
ثلاث أشهر	مخفف الـــ LDL	^{a}3.89 ± 48.13	^{a}2.67 ± 37.50	^{a}1.62 ± 31.88	^{a}2.45 ± 23.75	^{a}1.34 ± 17.50	^{a}2.27 ± 11.25	^{a}2.27 ± 6.25
	امخفف الـــ EY	^{b}1.89 ± 27.50	^{b}2.50 ± 22.50	^{b}2.50 ± 17.50	^{b}2.82 ± 11.88	^{b}2.06 ± 6.25	^{b}0.91 ± 1.88	^{b}0.00 ± 0.00
المعدل	مخفف الـــ LDL	^{a}2.04 ± 50.42	^{a}1.73 ± 40.00	^{a}1.34 ± 32.08	^{a}1.34 ± 25.42	± 19.167 ^{a}1.11	^{a}1.33 ± 14.17	^{a}1.50 ± 9.58
	امخفف الـــ EY	^{b}0.93 ± 30.21	^{b}1.06 ± 24.79	^{b}1.12 ± 19.58	^{b}1.36 ± 14.79	^{b}1.18 ± 9.38	^{b}0.85 ± 3.96	^{b}0.72± 1.67

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا فيما بينها ($P < 0.05$).



الشكل (1) تأثير LDL في الحركة الفردية للنطف بعد الإسالة للأشهر الثلاثة بعد التجميد

جدول (2) تأثير إضافة LDL إلى مخفف السائل المنوي للكباش في نسبة الإخصاب الخارجي للنطف بعد التجميد

نوع المخفف	عدد البويضات	نسبة الإخصاب (IVF)%
مخفف الـــ LDL	46	[a]2.34 ±24.17
امخفف الـــ EY	50	[b]2.44±14.38

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا فيما بينها ($P < 0.05$).

Low density-lipoproteins =LDL
Egg Yolk =EY

المناقشة

أظهرت نتائج الدراسة الحالية تفوق معنوي P<0.05 للمخفف الذي يحتوي 8% LDL على المخفف الـذي يحتوي 20%EY في الحركة الفردية لنطف الكباش بعد الإســالة (51.88 ± 3.26, 33.13 ± 0.91%) وقـد كانت هذه النتائج أعلى مما حصل عليه (18) (41.7±2.1، 31.2±2.1) للمخففين أعلاه علــى التــوالي فــي الكباش، وقد يكون السبب بتفوق LDL هو انه يوفر حماية واستقرار للأغشية البلازمية ومنع استنزاف وخــروج الفوسفوليبد والكوليسترول (19) واثبت كفاءة في توفير أفضل حماية للنطف (18) وإن انخفاض كفاءة المخفــف الذي يحتوي EY مقارنة بالمخفف الذي يحتوي LDL في حفظ النطف قد يكون بسبب احتــواء EY علــى مــواد ضارة للنطف وتثبيط العملية التنفسية فيها فضلاً عن ان HDL الموجود في EY وما يحتويه من حبيبات له تأثير ضار في النطف (20، 21، 22)، كما لاحظ (23) ان 80%من النطف تتعرض إلى أضرار بعد حضنها لمــدة أربع ساعات مع EY مقارنة مع 3% عند حضنها مع LDL، وقد ذكر (24) أهمية LDL في إدامة حركة النطف وسلامة الأغشية البلازمية خلال الحفظ بالتبريد لمدة لا تقل عن 50% أطول من غير المعاملة، وانه يقلل مــن التأثيرات الضارة التي تحدثها عملية التجميد على النطف. وقد أظهرت الدراسات المبكرة أهمية LDL في عملية تجميد السائل المنوي للبائن (25)، وقد ذكر كل من (26) ان LDL يتعرض إلى تكسر في أثناء عملية التجميــد والإسالة، وتحرر الفوسفوليبد ليكون طبقة حول النطف لحمايتها، فضلاً عن إمكانية مساهمته في التعويض عــن بعض الفوسفوليبد في الغشاء البلازمي. وذكر (27) ان LDL يعمل طبقة عازلة حول الأحماض الدهنية المكونة للغشاء البلازمي، إلى ان اثبت (11) ان ميكانيكية عمل LDL المستخلص من صفار البيض لا تتضمن ارتباطــا مباشرا مع الأغشية البلازمية للنطف من اجل توفير الحماية لها وإنما يكون عن طريق تفاعله وارتباطــه مــع Binder of Sperm Proteins (BSP) الموجود في البلازمــا المنويــة بتفاعــل (lipoprotein: protein interaction) مكونه معقداً (LDL-BSPproteins) ومنع BSP من الاتصال بأغشية النطف وما تسببه لها من أضرار (سحب الفوسفوليبد والكوليسترول) وان هذا التفاعل السريع والمعقد المتكون ثابت لا يتأثر بتغير درجــة الحرارة في أثناء عملية حفظ السائل المنوي (19). أما فيما يخص نسبة الإخصاب الخارجي فان الهدف الأساسي من حفظ وتجميد السائل المنوي هو الحصول على نطف لها القابلية على الإخصاب وان تفوق المخفــف الــذي يحتوي LDL قد يعود إلى ان سلامة الأغشية البلازمية للنطف وسلامة الاكروسوم بعد التجميد تكون أفضل عند استخدام LDL عما هو عليه عند استخدام صفار البيض (28) مما يؤدي إلى زيادة نسبة الإخصــاب الخــارجي باستخدام LDL (27).

المصادر

1. Andrabi, S. M. H. 2007. Fundamental principles of cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* bull spermatozoa. Mini review. Int. J. Agri. and Biol., 9: 367-369.
2. Mahfouz, R.; Sharma, R.; Thiyagarajan, A.; Kale, V.; Gupta, S.; Sabanegh, E. & Agarwal, A. 2010. Semen characteristics and sperm DNA fragmentation in infertile men with low and high levels of seminal reactive oxygen species. Fertil. Steril., doi:10.1016/j. fertnstert .12.030.
3. Purdy, P. H.; Mocé, E.; Stobart, R.; Murdoch, W. J.; Moss, G. E.; Larson, B.; Ramsey, S.; Graham, J. K. & Blackburn, H. D. 2010. The fertility of ram sperm held for 24h at 5 degrees C prior to cryopreservation. Anim. Reprod. Sci., 118(2-4): 231-235.
4. Fiser, P. S. & Fairfull, R. W. 1989. The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. Cryobiol., 26 (1): 64-69.
5. Manafi, M. 2011. Artificial Insemination in Farm Animals. Published by In Tech Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia.
6. Ruiz-Pesini, E.; Alvarez, E.; Enriquez, J. & Lopez-Perez, M. 2001. Association between seminal plasma carnitine and sperm mitochondrial enzymatic activities. Int. J. And., 24:335-340.
7. Januskauskas, A.; Johannisson, A. & Rodriguez-Martinez, H. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility.Theriogenology,60:743-758.
8. Garcia-Macias, V.; Martinez-Pastor, F.; Alvarez, M.; Borragan, S.; Chamorro, C. A.; Soler, A. J.; Anel, L. & de Paz, P. 2006. Seasonal changes in sperm chromatin condensation in ram (*Ovis aries*), Iberian Red deer (*Cervus elaphus hispanicus*), and Brown bear (*Ursus arctos*).J. Androl., 27:837-846.
9. Gillan, A.; Lindsay, B.; Chis, W. M.; Maxwell, A. & Gareth, A. 2004. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination Evans: www.publish.csiro.au/journals/rfd© CSIRO.
10. Anton, M.; Le Denmat, M.; Beaumal, V. & Pilet, P. 2001. Filler effects of oil droplets on the rheology of heat-set emulsion gels prepared with egg yolk and egg yolk fractions Colloid Surf. Biointerfaces, 21: 137-147.
11. Manjunath, P.; Nauc, V.; Bergeron, A. & Ménard, M. 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. Biol. Reprod., 67: 1250-1258.
12. Moussa, M.; Martinet, V.; Trimeche, A.; Tainturier, D. & Anton, M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. Theriogenology, 57: 1695-1706.
13. McBee, L. & Cotterill, O. J. 1979. Ion exchange chromatography and electrophoresis of egg yolk. J. Food Sci., 44:656-660.
14. Rezk, W. A. K. 2009. Studies on In Vitro Fertilization in Camels (*Camelus dromedaries*). Faculty of Agriculture Animal Production Department Mansoura University (PhD thesis).
15. DeSmedt, V.; Crozed, N.; Ahmed-Ali, M.; Martino, A. & Cogine, Y. 1992. In vitro maturation and fertilization of goat ocytes. Theriogenology, 37: 1049-1060.
16. SAS, 2004. SAS/STAT Users Guide for personal computers. Release 9.1.SAS Institute Inc./Cary, N.C., USA.
17. Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F tests. Biometrics, 11:1-42.

18. Tonieto, R. A.; Goularte, K. L.; Gastal, G. D. A.; Schiavon, R. S.; Deschamps, J. C. & Lucia, Jr. T. 2010. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. Short communication. Small Rum. Res., 93: 206-209.
19. Bergeron, A.; Marie, C.; Yves, B. & Puttaswamy, M. 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.
20. Pace, M. M. & Graham, E. F. 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. J. Anim. Sci., 39:1144-1149.
21. Watson, P. F. & Martin, C. A. 1975. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5°C. Aust. J. Biol. Sci., 28:145-52.
22. Demianowicz, W. & 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., 31:279-280.
23. Amirat, L.; Anton, M.; Tainturier, D.; Chatagnon, G. & Battut, I. C. J. L. 2005. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl before, during and after freezing and thawing. Reprod.,129:535-543.
24. Junior, A. S.; Corcini, C. D.; Ulguim, R. R. & Alvarenga, M. V. 2009. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. Short communication. Anim. Reprod. Sci., 115: 323-327.
25. Polge, C.; Salamon, S. & Wilmut, I. 1970. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. Vet. Rec., 87:424-428.
26. Graham, J. K. & Foote, 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. Cryobiol., 24:42-52.
27. Amirat, L.; Daniel, T.; Laetitia, J.; Chantal, T.; Olivier, G.; Jean, L. C. & Marc, A. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl1, a commercial egg yolk extender. Theriogenology, 61:895-907.
28. Hu, J.; Qing-Wang, L.; Gang, L.; Xiao-Yu, C.; Hai, Y.; Shu-Shan, Z. & Li-Qiang, W. 2006. The Cryoprotective Effect on Frozen-thawed Boar Semen of Egg Yolk Low Density Lipoproteins. J. Anim. Sci., 19(4): 486-494.