تأثير إضافة بلازما صفار البيض المجفدة في المؤشرات المخبرية للسائل المنوي المجمد عند الثيران

سعيد محمد ناصر السليمان[1*]، محمد زهير الأحمد [2]، أسامة الحمود الياسين[3]، محمد موسى [4]

[1]طالب دراسات عليا (دكتوراه)، قسم الجراحة والولادة، كلية الطب البيطري، جامعة حماة، حماة، سوريا.

[2]أستاذ تناسليات التلقيح الاصطناعي، قسم الجراحة والولادة، كلية الطب البيطري، جامعة حماة، حماة، سوريا.
zuher35@yahoo.fr

[3]أستاذ مساعد في الإنتاج الحيواني، قسم الإنتاج الحيواني، كلية الطب البيطري، جامعة الفرات، ديرالزور، سوريا.
oush42@alfuratuniv.edu.sy

[4]أستاذ نقل الأجنة، رئيس قسم الجراحة والولادة، كلية الطب البيطري، جامعة حماة، حماة، سوريا.
mmoussa194@gmail.com

(*) الباحث المرسل: saeed.s@hama-univ.edu.sy

ORCID: https://orcid.org/0009-0007-3858-2092

الملخص

نُفذ هذا البحث في مركز التلقيح الاصطناعي وإنتاج السائل المنوي في الغزلانية – دمشق، بهدف دراسة تأثير استبدال صفار البيض التقليدي ببلازما صفار البيض المجفدة بنسب مختلفة في ممددات السائل المنوي للثيران بعد التجميد والإذابة. شملت الدراسة أربعة ممددات: الممدد التقليدي الحاوي على 20% صفار بيض (EY)، وثلاثة ممددات تجريبية استُبدل فيها الصفار ببلازما صفار البيض المجفدة بنسب 20% و40% و60%. جُمع السائل المنوي باستخدام المهبل الاصطناعي من ثيران فريزيان هولشتاين خضعت لظروف رعاية موحدة، ثم مُدد وفق البرنامج المعتمد في المركز، وجُمد في قشات وحُفظ في السائل الآزوتي. جرى تقييم العينات بعد الإذابة باستخدام جهاز Computed Assisted Semen Analyzing (CASA) لقياس مؤشرات الحركية

(MOT, PROG, VCL, VSL, VAP, ALH, STR, LIN) ، إضافة إلى اختبار HOST لتقييم سلامة الغشاء البلازمي، واختبار الإيوزين–نيكروزين لتحديد نسب النطف الحية والميتة. أظهرت النتائج تفوقاً معنوياً واضحاً للممدد الحاوي على 60% من بلازما صفار البيض المجفدة، إذْ سجّل أعلى القيم في الحركية العامة والحركية التقدمية مقارنةً بالممدد التقليدي وباقي التراكيز، مما يشير إلى قدرة البلازما المجفدة على تعزيز مقاومة النطف لصدمة التجميد والإذابة. كما بينت الاختبارات المرافقة تحسناً في سلامة الغشاء البلازمي وارتفاع نسبة النطف الحية في الممددات الحاوية على البلازما، ولا سيما عند التركيز الأعلى (60%). تؤكد هذه النتائج إمكانية اعتماد بلازما صفار البيض المجفدة كبديل فعّال لصفار البيض التقليدي، لما توفره من ثباتية أعلى، وسهولة في النقل والتخزين، وكفاءة واضحة في حماية نطف الثيران أثناء عمليات التجميد والإذابة.

الكلمات المفتاحية: ثيران، ممددات السائل المنوي، بلازما صفار البيض، تجفيد، HOST، إيوزين–نيكروزين.

ورد للنشر بتاريخ: 23 / 4 / 2026

قبل للنشر بتاريخ : 3 / 6 / 2026

2026 © المؤلف (المؤلفون).هذا المقال منشور بنظام الوصول المفتوح بموجب ترخيص CC BY-NC-SA 4.0

Effect of Adding of Lyophilized Egg Yolk Plasma on Laboratory Parameters in Bulls cryopreserved Semen.

Saeed Mohammad Nasser Al-Suleiman[1*], Mohamad Zuher Al-Ahmad[2], Osama Al-Hamoud Al-Yaseen[3], Mohammad Moussa[4]

[1]PhD Student, Department of Surgery and Obstetrics, Faculty of Veterinary Medicine, Hama University, Hama, Syria.
[2]Professor of Theriogenology and Artificial Insemination, Department of Surgery and Obstetrics, Faculty of Veterinary Medicine, Hama University, Hama, Syria.
zuher35@yahoo.fr
[3]Associated Professor of Animal Production, Department of Animal Production, Faculty of Veterinary Medicine, Al-Furat University, Deir ez-Zor, Syria.
oush42@alfuratuniv.edu.sy
[4]Professor of Embryo Transfer, Head of Department of Surgery and Obstetrics, Faculty of Veterinary Medicine, Hama University, Hama, Syria.
mmoussa194@gmail.com
(*) Corresponding Author: Email: saeed.s@hama-univ.edu.sy
ORCID: https://orcid.org/0009-0007-3858-2092,

Abstract

This research was conducted at the Artificial Insemination and Semen Production Center in Al-Ghazlaniyah, Damascus. The study aimed to evaluate the impact of replacing traditional egg yolk with varying proportions of lyophilized egg yolk plasma (LYOP) in bull semen extenders on post-thaw quality. Four extenders were examined: a control extender containing 20% traditional egg yolk (EY), and three experimental extenders where EY was replaced with LYOP at concentrations of 20%, 40%, and 60%. Semen was collected via artificial vagina from Friesian-Holstein bulls maintained under standardized management conditions. The samples were diluted according to the center's established protocols, packaged in straws, and cryopreserved in liquid nitrogen. Post-thaw evaluation was performed using a Computer-Assisted Semen Analysis (CASA) system to measure kinematic parameters, including MOT, PROG, VCL, VSL, VAP, ALH, STR, and LIN. Additionally, the Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST) was employed to assess plasma membrane integrity, while Eosin-Nigrosin staining was used to determine the live/dead spermatozoa ratio. The results demonstrated a significant superiority of the extender containing 60% LYOP, which recorded the highest values for total and progressive motility compared to the control and other concentrations. This indicates that lyophilized plasma enhances sperm resistance to cryoshock during the freezing-thawing process. Furthermore, complementary tests revealed improved plasma membrane integrity and higher viability rates in plasma-based extenders, particularly at the 60% concentration. These findings confirm that lyophilized egg yolk plasma is an effective alternative to traditional egg yolk, offering greater stability, ease of transport and storage, and superior cryoprotective efficiency for bull spermatozoa.

Key words: Bulls, Semen Extenders, Egg Yolk Plasma, Lyophilization, HOST, Eosin-Nigrosin.

Received : 23/4/2026

Accepted : 3/6/2026

© 2026 Author(s). This article is published under the Open Access License CC BY-NC-SA 4.0

المقدمة:

يعد فقدان حيوية النطف أو موتها بعد التجميد والإذابة من أهم التحديات التي تواجه حفظ وتخزين السائل المنوي (Galmidi *et. al.,* 2025)، حيث أن الحفظ بالسائل الآزوتي يعرض النطف لإجهاد حراري وأسموزي حاد وتكون بلورات جليدية في الوسط الحاوي على النطف (Hai *et. al.,* 2024)، تؤدي هذه العوامل مجتمعة إلى تخرب الأغشية الخلوية والبروتينات وفقدان نحو 40% إلى 50% من حيوية النطف وقدرتها الإخصابية (Rauch, 2013). تعزى هذه الأضرار المعروفة الناتجة عن التجميد والإذابة إلى مجموعة من العوامل، بما في ذلك الإجهاد الحراري الناجم عن التغيرات السريعة في درجة الحرارة، والإجهاد التناضحي الناتج عن استخدام عوامل الحماية من التجميد، وتكوين بلورات الجليد داخل وخارج الخلايا، مما يؤدي إلى تقلص الخلية المنوية وتخرب غشائها بشكل غير عكوس (Chen *et. al.,* 1993). تبرز هذه العوامل أهمية جوهرية للمحلول الممدد الذي يهدف لتوفير بيئة مثالية تحمي النطف وتمدها بالطاقة اللازمة، إذ يحتوي المحلول الممدد عادةً على مواد مغذية للنطف، ومواد تحميها من صدمة البرد وصادات حيوية لمنع انتقال العدوى بالإضافة للمواد الدارئة للحموضة والتي تعمل على تعديل حموضة المحلول الممدد بما يناسب النطف (Ugur *et. al.,* 2019).

تلعب واقيات البرودة غير النفوذة دوراً مهماً في حماية النطف وذلك لأنها غير قادرة على عبور أغشية النطف وتتألف من السكريات أو البروتينات أو الدهون، تعمل على زيادة الضغط التناضحي للوسط المحيط بالخلايا مما يساعد على سحب الماء من داخل النطف ومنع تكون البلورات الجليدية داخلها كما يمكنها الالتصاق بجدار النطف خلال عمليتي التجميد والإذابة مما يؤدي إلى حماية هذه النطف من التغيرات الحرارية (Lemma, 2011; Sieme *et. al.,* 2016). استعملت عدة واقيات برودة غير نفوذة مثل (صفار البيض ومشتقاته، الحليب كامل أو مسحوب الدسم، حليب جوز الهند، مصل الألبومين البقري، البولي فينيل الكحولي) (Raheja *et. al.,* 2018).

يعتبر صفار البيض واقي البرودة غير النفوذ الأكثر شيوعاً في حماية نطف الثدييات، ويعود تاريخ استخدامه كمكون أساسي في ممددات السائل المنوي إلى عام 1939 (Phillips and Lardy, 1940)، إذْ لا يزال الواقي الرئيس من صدمة البرد بفضل احتوائه على جزيئات بروتينية منخفضة الكثافة (LDL) وفوسفوليبيدات وكوليسترول تعمل على تثبيت غشاء النطفة ومنع فقدان الدهون الفوسفورية أثناء عمليات التجميد والإذابة (Amirat *et. al.,* 2004)، فضلاً عن بروتيناته الكارهة للماء وسهولة ووفرة الحصول عليه (Bustani and Baiee, 2021). ومع ذلك، ارتبط استخدام الصفار الكامل بتحديات فنية وصحية، منها احتمال التلوث الجرثومي بكتيريا السالمونيلا (Layek *et. al.,* 2016)، والتباين الكبير في التركيب الكيميائي بين الدفعات (Moreno *et. al.,* 2013)، بالإضافة إلى وجود الحبيبات الدهنية التي تعيق وضوح الرؤية المجهرية وتتداخل مع دقة أنظمة التحليل المحوسب للسائل المنوي (Singh *et. al.,* 2021). نتيجة لهذه المعوقات، وجدت عدة طرق لاستخلاص الجزيئات البروتينية منخفضة الكثافة (LDL) من صفار البيض الكامل، استخلصت هذه الجزيئات بنقاوة 97% وأعطت أملاً كبيراً في انتشار تقنية التلقيح الاصطناعي

وممددات السائل المنوي (Moussa et. al., 2002)، إلى أن صعوبة عملية الاستخلاص فضلاً عن صعوبة نقلها أو تخزينها وجهت الأبحاث نحو استخدام بدائل بسيطة ومتطورة مثل بلازما صفار البيض (Belala *et. al.,* 2019).

تمثل بلازما صفار البيض نحو 78% من كتلة الصفار الكامل، وذلك بعد تثفيله والتخلص من الحبيبات الدهنية (Mc bee and Cotterill, 1979). تشكل جزيئات الـ LDL 85% من كتلة بلازما صفار البيض وهي الجزيئات المسؤولة عن حماية النطف ويشكل الليفيتين 15% من باقي كتلة البلازما (Amirat, 2004; Anton, 2007).

ذكرت عدة دراسات تفوق الممددات الحاوية على بلازما صفار البيض السائلة على الممددات الحاوية على صفار البيض التقليدي، حيث ذكر (Pillet *et. al.,* 2011) أن نسبة الحمل ارتفعت من 60% إلى 69% بعد تلقيح الأفراس اصطناعياً بسائل منوي يحوي على 2% بلازما صفار البيض السائلة بدلاً عن 2% من ممدد صفار البيض التقليدي. كما ذكر (Corcini *et. al.,* 2015) أن استبدال صفار البيض الكامل ببلازما صفار البيض السائلة أعطى نتائج معنوية من حيث الحركية العامة والحركية الأمامية التقدمية في نطف الكلاب بعد التجميد والإذابة، إذ ارتفعت نسبة الحركية العامة من (45.2%) إلى (61.4%)، كما حافظت بلازما صفار البيض السائلة بشكل معنوي على سلامة الغشاء السيتوبلازمي والجسيم الطرفي. لوحظت النتائج نفسها عند استخدام بلازما صفار البيض عند الجاموس إذْ ذكر شاه وزملاؤه أن السرعة الأمامية لنطف الجاموس قد ارتفعت من (3.99±19.25%) إلى (2.28±49.83%) عند استبدال صفار البيض التقليدي ببلازما صفار البيض السائلة بنسبة 20%، كما ارتفعت نسبة الحمل من (64.49%) إلى (76.61%) (Shah *et. al.,* 2017).

أشارت إحدى الدراسات إلى إمكانية تجفيد بلازما صفار البيض السائلة مما يسمح بإطالة حفظها وسهولة استعمالها (Belala *et. al.,* 2019)، إذْ يعرف التجفيد أو التجفيف بالتجميد كأداة فعالة لتعزيز كفاءة بلازما صفار البيض وذلك بإزالة الماء منها بالتسامي، مما يسمح بالحفاظ على الخصائص الوظيفية والبنية الدقيقة لبلازما صفار البيض وإطالة مدة صلاحيتها في درجات حرارة الغرفة (Marcet *et. al.,* 2022). يهدف هذا البحث الى دراسة تأثير استخدام بلازما صفار البيض المجفدة بنسب مختلفة في حماية نطف بعد التجميد والإذابة عند الثيران من خلال دراسة بعض المؤشرات الحركية (MOT, PROG, VCL, VSL, VAP, ALH, STR, LIN) وتقييم حيوية النطف بعد التجميد والاذابة.

مواد البحث وطرائقه:

نفذ البحث في مركز التلقيح الاصطناعي وإنتاج السائل المنوي التابع لوزارة الزراعة في محافظة دمشق منطقة الغزلانية، وفي مختبر التقانات الحيوية (كلية الزراعة – جامعة دمشق)، تم العمل على تأمين المواد وتجهيز الممددات وإنتاج السائل المنوي في الفترة الممتدة بين شهري شباط وحزيران من العام 2024.

تم جمع السائل المنوي من ثيران التلقيح الاصطناعي من سلالة الفريزيان هولشتاين، تابعة لمركز (الغزلانية لإنتاج السائل المنوي – مديرية الإنتاج الحيواني) ضمن مدينة دمشق. أخضعت جميع الثيران المتقاربة

بالعمر لشروط الرعاية ذاتها خلال فترة التجربة، وقدمت نفس العليقة لجميع الثيران، كما أخضعت للبرنامج الصحي الوقائي المعتمد في المحطة. تم الجمع بالطريقة المستخدمة في مركز التلقيح الاصطناعي بعد تحضير الثور بشكل جيد، حيث جمع السائل المنوي مرتين أسبوعياً وبفاصل 3 أيام بمهبل اصطناعي مدفأ لدرجة 42 درجة مئوية. تم تقييم السائل المنوي بعد القذف من كل حيوان مباشرةً وتم اعتماد السائل المنوي الذي بلغت حركيته أكثر من 60%، ثم تم خلط العينات وتقسيمها بما يتناسب مع محاليل التجربة.

استخلاص وتجفيد بلازما صفار البيض:

تم الحصول على بلازما صفار البيض السائلة من بيض دجاج طازج تم غسله بالماء الفاتر أولاً، ثم بالماء المقطر، وبعد ذلك عقّم بالكحول الإيثيلي بتركيز 70% لتجنب التلوث أثناء عملية الفصل، تم كسر البيضة يدوياً إلى نصفين تقريباً، وأزيل البياض تماماً. ثقل صفار البيض الناتج كاملاً بعد تمديده بمحلول ملحي (NaCl) بنسبة (حجم/حجم) ثم تحريكه لمدة ساعة على خلاط مغناطيسي قبل التثفيل بسرعة 10,000 دورة/دقيقة ولمدة 45 دقيقة على درجة حرارة 10 مئوية، تم تثفيل الجزء الطافي مرة أخرى لإزالة الحبيبات بشكل كامل. بعد ذلك تم حفظ البلازما بدرجة +4 مئوية لحين الاستخدام.

نقلت عينات البلازما مبردة من مركز الغزلانية الى مختبر التقانات الحيوية التابع لوزارة الزراعة، حيث تم تجفيد بلازما صفار البيض للحصول عليها على شكل مسحوق، وضعت العينات في أطباق بتري بسماكة 1 سم، استخدمت مجفدة مخبرية من نوع (CHRIST – alpha 1-2 LD) ألمانية الصنع، تحت درجة برودة −55 وضغط يصل حتى −1 بار، ثم عبئت بزجاجات محكمة الإغلاق وحفظت بدرجة حرارة الغرفة (18 – 25) درجة مئوية لحين الاستخدام.

تحضير ممددات التجربة:

حضرت أربعة ممددات الممدد الأول (EY) (الممدد الشاهد) وهو عبارة عن 20 % من صفار البيض الكامل، الممدد الثاني (LyoP 20): أستبدل فيه صفار البيض الكامل بـ 20% وزن/حجم من بلازما صفار البيض المجفدة، الممدد الثالث (LyoP 40): أستبدل فيه صفار البيض الكامل بـ 40% وزن/حجم من بلازما صفار البيض المجفدة، الممدد الرابع (LyoP 60): أستبدل فيه صفار البيض الكامل بـ 60% وزن/حجم من بلازما صفار البيض المجفدة.

تم الخلط على خلاط مغناطيسي لمدة ساعة كاملة لضمان التمازج، مع الحفاظ على بقية مكونات محلول التمديد ذاتها في ممدد الشاهد التقليدي، وفق الجدول رقم (1). قُسم بعد ذلك الممدد إلى قسمين متساويين (كل قسم 50 مل)، القسم الأول تم إضافة الغليسيرول فيه بنسبة 5% والجزء الثاني بنسبة 2 % وذلك للوصول لنسبة 7 % من الغليسيرول في الجزئين. تم ذلك مع الاستمرار في التحريك والمزج باستخدام خلاط مغناطيسي لضمان تجانس المكونات بالكامل، ليصبح المحلول الممدد جاهزاً للاستخدام. تم إضافة السائل

المنوي للجزء المحتوي على 2% من الغليسيرول بدرجة حرارة الغرفة، ثم تم إضافة الجزء الثاني على درجة حرارة 4 مئوية.

الجدول رقم (1): مكونات محاليل التمديد المستخدمة.

الممددات المستخدمة				
LyoP 60	**LyoP 40**	**LyoP 20**	**EY**	**مكونات الممدد**
Lyophilized egg yolk plasma (w/v) 60%	Lyophilized egg yolk plasma (w/v) 40%	Lyophilized egg yolk plasma (w/v) 20%	Egg yolk (ml) 20	
Tris (g) 2.4	Tris (g) 2.4	Tris (g) 2.4	Tris (g) 2.4	
Citric acid (g) 1.4	Citric acid (g) 1.4	Citric acid (g) 1.4	Citric acid (g) 1.4	
Fructose (g) 1	Fructose (g) 1	Fructose (g) 1	Fructose (g) 1	
Dihydro Streptomycin (ml) 0.1	Dihydro Streptomycin (ml) 0.1	Dihydro Streptomycin (ml) 0.1	Dihydro Streptomycin (ml) 0.1	
Distilled water (ml) QSP 100	Distilled water (ml) QSP 100	Distilled water (ml) QSP 100	Distilled water (ml) QSP 100	
glycerol 7%	glycerol 7%	glycerol 7%	glycerol 7%	

مداولة السائل المنوي:

تم تقييم السائل المنوي بعد القذف والجمع من كل حيوان مباشرةً وقبل إضافة أي ممددات، لتقييم نوعيته وملائمته للتجميد عن طريق التقييم العياني (الحجم واللون والقوام)، والتقييم المجهري الذي يتضمن الحركية العامة، والحركية التقدمية الأمامية، على صفيحة مدفأة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية.

بعد إجراء التقييم المجهري المباشر والتأكد من صلاحية قذفات كل ذكر للاستخدام، تم فحص العينة لقياس التركيز باستخدام المضواء (photometer) لمعرفة عدد القشات المُمكن إنتاجها من العينة وكمية محلول التمديد الواجب إضافته إلى عينة السائل المنوي المفحوصة. بعد الحصول على المعلومات المطلوبة قُسمت عينة السائل المنوي بواسطة ماصة إلى أحجام متساوية تماثل عدد المحاليل المختبرة في التجربة، ووضع كل قسم في أنبوب زجاجي مُدفأ في الحمام المائي ثم أُضيف إلى كل قسم محلول التمديد المختبر بالحجم المناسب ببطء وحركة دورانية حول الأنبوب لضمان مزج محلول التمديد مع السائل المنوي بشكل جيد، ثم غُطي الأُنبوب الحاوي على السائل المنوي المُمدد بورق الألمنيوم ووضع بعدها لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة قبل إدخال العينات إلى حجرة التبريد على درجة + 4°م لمدة 2.5 ساعة وهي فترة التوازن والتبريد، بعد 2.5 ساعة (نهاية مرحلة التوازن) نقل السائل الممدد الى آلة التعبئة.

استخدمت قشات بسعة (0.25 مل)، حيث تم تعبئة كل قشة بـ 20 مليون نطفة، باستخدام آلة تعبئة القشات آلياً داخل حجرة التبريد. ثم جمدت القشات يدويا باستخدام بخار السائل الآزوتي، ثم التغطيس بالسائل الازوتي بعد ذلك إلى خزان الآزوت للحفظ بدرجة حرارة −196 درجة مئوية.

تقييم السائل المنوي بعد الإذابة باستخدام جهاز (CASA):

قيمت المؤشرات الحركية للنطف باستخدام جهاز تحليل السائل المنوي بمساعدة الحاسوب (CASA)، حيث تم استخدام جهاز كازا Mira Lab Semen Analysis النسخة العاشرة. أُجْري هذا الاختبار على مدار ثلاثة أيام عمل بعد الانتهاء من تحضير قشات كل من الممددات حيث أُذيبت ثلاث قشات من كل ممدد من ممددات التجربة ومُزجَت معاً بعد تحضينها لمدة 30 ثانية بدرجة حرارة 37°م. أُخذت عينة 5 ميكروليتر من السائل المنوي ووضعت على طرف الساترة ضمن شريحة التحليل المُدَفأة بدرجة حرارة 37°م، تم اختيار عشرة حقول وحسابها عشوائياً وتقييمها لأخذ بيانات من 200 – 250 نطفة/عينة على الأقل لقياس الحركية العامة والحركية التقدمية الأمامية والمؤشرات الأخرى الموضحة في الجدول رقم (2).

الجدول رقم (2): المؤشرات المدروسة لحركة نطف الثيران بعد الإذابة باستخدام جهاز الكازا.

مؤشر الحركة	الرمز (المختصر)	المصطلح الانكليزي	وحدة القياس
الحركية العامة	MOT	Motility	%
الحركية التقدمية	PROG	Progressive Motility	%
السرعة الخطية المنحنية	VCL	Velocity Curved Line	ميكرون/الثانية
السرعة الخطية المستقيمة	VSL	Velocity Straight Line	ميكرون/الثانية
معدل سرعة المسار	VAP	Velocity Average Path	ميكرون/الثانية
المدى الجانبي لضربات الرأس	ALH	Lateral Head Displacement	ميكرون
معدل ضربات الرأس	BCF	Beat-Cross Frequency	هرتز
خطية المسار	LIN	Linearity	%
الاستقامة	STR	Straightness	%

كما استُخدم اختبار الإيوزين –نيكروزين لتقدير النطف الحية بعد عملية التجميد والإذابة، إذْ تم من خلاله تحديد نسبتي النطف الحيّة والميتة. باستخدام مجهر ضوئي على درجة تكبير 400 X وذلك وفقاً للطريقة الموصوفة (Evans & Maxwell, 1987).

استخدم أيضاً اختبار HOST لتقييم سلامة الغشاء البلازمي بعد عملية التجميد والإذابة، أُذيبت القشات الحاوية على السائل المنوي في حمام مائي بدرجة حرارة 37°م لمدة 30 ثانية ومن ثم خُلط 50 ميكروليتر من السائل المنوي بعد الإذابة مع 1 مل من محلول سترات الصوديوم مع الفركتوز المُحضر مسبقاً وقيمة

الضغط التناضحي فيه (100 ميلي أوزمول) وتحضينه بدرجة 37°م لمدة 45 دقيقة (García–López *et al.,* 1996). فحص 15 ميكروليتر من خليط العينة على شريحة مدفأة 37 درجة مئوية ومغطاة بساترة تحت المجهر الضوئي بدرجة تكبير X400، اعْتبرت النطف السليمة تلك التي تملك ذيل ملتف بعد تعريضها لمحلول منخفض الحلولية. تم عد 300 نطفة من كل شريحة وصُنفت إلى سليمة أو غير سليمة اعتماداً على وجود التفاف في الذيل من عدمه.

التحليل الاحصائي:

استخدم في التحليل الإحصائي برنامج الإكسل 2019، والبرنامج الاحصائي Spss v27.

حيث تم إجراء الدّراسة باستخدام الأساليب الإحصائيّة الآتية:

- استعرضت النتائج على شكل المتوسط الحسابي ± الخطأ المعياري.
- تمت مقارنة المتوسطات بين المجموعات للمتغيرات الرقيمة ذات التوزع الطبيعي باستخدام الاختبار المعلمي One Way ANOVA.
- ومقارنة المتوسطات بين المجموعات للمتغيرات الرقمية ذات التوزع غير الطبيعي باستخدام الاختبار اللامعلمي Kruskal Wallis.تم اعتماد قيم P الأقل من 0.05 ذات أهمية إحصائيّة.

النتائج والمناقشة:

الحركية العامة والحركية الأمامية التقدمية:

إن الهدف من هذا البحث هو دراسة تأثير إضافة بلازما صفار البيض المجفدة على بعض المؤشرات المخبرية للسائل المنوي عند الثيران، استخدمت بلازما صفار البيض السائلة على مستوى واسع في ممددات السائل المنوي للثدييات بدلاً عن صفار البيض التقليدي، وذلك لسهولة استخلاصها ومحتواها العالي جداً من الجزيئات البروتينية منخفضة الكثافة والمسؤولة عن حماية النطف من التغيرات الحرارية أثناء التجميد والإذابة (Anton, 2013; Moussa *et. al.,* 2002). فضلاً عن إمكانية تجفيدها مما يسهل عملية حفظها أو نقلها واستخدامها (Belala *et. al.,* 2019).

الجدول رقم (3): المقاييس الإحصائية الوصفية وقيمة (P) الاحتمالية لمجموعات الدراسة (EY, LyoP20%, LyoP40%, LyoP60%) فيما يتعلق بمتوسطات قيم الحركية العامة والحركة الأمامية التقدمية ± الخطأ المعياري، حيث اعتبرت النتائج معنوية عند قيمة (P≤0.05).

الممدد المستخدم	EY	20% LyoP	40% LyoP	60% LyoP	p-value
Motility %	28.90 ± 6.03	32.35 ± 6.5	36.83 ± 2.9	51.18 ± 1.19	**0.026**
Progressive motility %	16.73 ± 3.4	19.98 ± 4.3	22.93 ± 1.4	30.33 ± 4.5	**0.048**

لوحظ من خلال التحليل الحاسوبي (CASA) لمؤشرات السائل المنوي في دراستنا، الجدول رقم (3). أن إضافة بلازما صفار البيض المجفدة كان لها تأثيراً إيجابياً واضحاً في الحركية العامة للنطف (Motility)، حيث أن إضافة 60% (وزن/حجم) أظهرت تفوقاً معنوياً (P<0.05) في الحركية العامة للنطف بالمقارنة مع تركيزي 20% و40% (وزن/حجم) من بلازما صفار البيض المجفدة، وممدد صفار البيض التقليدي EY. إذ بلغت نسبة الحركية العامة للنطف في المحلول المحتوي على 60% من البلازما المجفدة (51.18%)، بالمقارنة مع تركيزي 20% و40% وممدد صفار البيض التقليدي (32.35%) (36.83%) (28.90%) على التوالي. كما لوحظ أيضاً تفوق معنوي (P<0.05) بعد إضافة بلازما صفار البيض المجفدة في مؤشر الحركة الأمامية التقدمية (Progressive Motility) للنطف لمجموعة 60% (وزن/حجم) من بلازما صفار البيض المجفدة بالمقارنة مع تركيزي 20% و40% (وزن/حجم) من بلازما صفار البيض المجفدة، وممدد صفار البيض التقليدي EY. إذْ بلغت نسبة الحركية التقدمية للنطف في المحلول المحتوي على 60% من البلازما المجفدة (30.33%)، بالمقارنة مع تركيزي 20% و40% وممدد صفار البيض التقليدي، على التوالي (19.98%) (22.93%) (16.73%). توافقت نتائج دراستنا مع ما حصل عليه (Shah *et. al.,* 2016) عند مقارنة ممدد بلازما صفار البيض السائلة بممدد صفار البيض التقليدي إذْ حسنت بلازما صفار البيض السائلة من قيم الحركية العامة بشكل معنوي (55.3%، 27.7%) والتقدمية (49.83%، 19.25%)، على التوالي عند الجاموس. وهذا ما حصلنا عليه في دراستنا حيث أن بلازما البيض هي الجزء المهم من صفار البيض في حماية النطف وذلك لاحتوائها بشكل رئيسي على 85% من (LDL) وهو الجزء المسؤول عن حماية النطف أثناء الحفظ بالتجميد (Pace & Graham, 1974)، إذْ تشكل طبقة واقية تحمي النطف وتساعد على استقرارها أثناء التغيرات الحرارية الناتجة عن التجميد والإذابة بسبب قدرتها العالية على الالتصاق بالنطف (Bencharif *et al.,* 2010; Hu *et al.,* 2010; Watson & Martin, 1975)، فضلاً عن تعويض بعض الدهون الفوسفورية التي يفقدها غشاء النطف أثناء التجميد والإذابة، إذْ يضعف فقدان الدهون الفوسفورية الموجودة في غشاء النطف من عملية تنشيط النطف وتفاعل الجسيم الطرفي (Hula & Marhitych, 1994). عزت بعض الدراسات إلى أن ضعف الجزيئات البروتينية منخفضة الكثافة المجفدة بشكلها الخالص في حماية الحيامن عند الثدييات إلى تخرب الصيغة الجزيئية أثناء التجفيد بسبب فقدان الماء مما ينعكس سلباً على قدرتها في حماية الحيامن (Moustacasa *et al.,* 2011; *Neves et al.*, 2014). كما وافقت نتائجنا مع ما حصل عليه (Belala *et al.,* 2019) عند استعمال بلازما صفار البيض المجفدة في حماية نطف الكلاب، إذْ كانت الحركية العامة والتقدمية في ممدد بلازما صفار البيض المجفدة بنسبة 40% مشابهة للنتائج الحاصلة عند استخدام جزيئات الـ LDL والذي سبق تفوقها على صفار البيض الكامل في دراسة أخرى (Corcini *et al.,* 2016). حيث أن التجفيد لا يرفع من حرارة المادة لأكثر من 30 درجة مئوية، يقي ذلك من إتلافها بالحرارة أو بالبلورات الجليدية، مما يسهل من حفظها واستخدامها والمحافظة على فعاليتها وخواصها الكيميائية والفيزيائية (Ariantie *et al.,* 2021; Bansal *et al.,* 2011). يعزى الاختلاف الحاصل في نسبة البلازما المجفدة إلى الفرق بين

حساسية نطف المجترات لاسيما الثيران مقارنةً مع الكلاب للحفظ بالبرودة (Khalil *et al.,* 2018) ، حيث أنه خلال استخلاص بلازما البيض، يتم تمديد الصفار بنسبة 1:1 من المحلول الملحي، مما يعني أن كل 20% من صفار البيض تعادل 40% بلازما والذي يعادل أيضاً نسبة 6% من الـ LDL وهي النسبة الأفضل لحفظ النطف عند الكلاب (Anton *et al.,* 2003; Bencharif & Dordas–Perpinya, 2020)، بينما 60% من البلازما المجفدة تعادل تقريباً 9% من الـ LDL وهي النسبة الأفضل لحفظ النطف عند الثيران، إذْ ذكر (Hu *et al.,* 2010) أن 7 – 10 من الـ LDL حققت النسبة الأفضل لحفظ النطف بالتجميد عند الثيران. كما درس (Belala *et. al.,* 2019) مقارنة الممدد الحاوي على بلازما صفار البيض السائلة والمجفدة بنسبة 40% مع الممدد الحاوي على الجزيئات البروتينية منخفضة الكثافة بنسبة 6%، أكدت النتائج عدم وجود فروقات معنوية بين الممددات المدروسة في قدرة الحماية إلا أن عملية استخلاص البلازما كانت أسهل بكثير من عملية عزل الجزيئات البروتينية منخفضة الكثافة.

مؤشرات حركية النطف (VCL, VSL, VAP, ALH, BCF, LIN, STR):

تشير معطيات الجدول (4) إلى نتائج التحليل الحاسوبي لمؤشرات السائل المنوي (CASA) التي تميز مؤشرات حركية النطف المختلفة مثل VCL، VSL، LIN، STR، BCF، إلى عدم وجود تفوق معنوي ($P>0.05$) بين مجموعات الدراسة الأربع (EY, LyoP20%, LyoP40%, LyoP60%). تتوافق هذه النتائج مع ما حصل عليه الباحثون في عدة دراسات (Belala *et al.,* 2019; Murphy *et al.,* 2018)، يبرر عدم وجود الفروق المعنوية بين العينات إلى التحديات المرتبطة بضبط إعدادات CASA وتباين الأنظمة المستخدمة، مما قد يحدّ من القدرة على الكشف عن فروق دقيقة بين المعالجات المختلفة (Singh *et. al.,* 2021). كما يعود تفوق الممدد المحتوي على البلازما المجفدة بفروقات صغيرة غير معنوية على ممدد صفار البيض التقليدي إلى وجود الحبيبات الدهنية في ممدد صفار البيض التقليدي (Anton, 2013; Shah *et al.,* 2016)، والتي قد تتداخل مع آلية عمل النطف عن طريق إعاقة حركية النطف والتأثير سلباً على التنفس الخلوي، كما تتداخل مع طرق التقييم المخبرية للسائل المنوي إذْ قد يقرأها جهاز الكازا على أنها نطفة ميتة (Akhter *et al.,* 2011; Amirat *et al.,* 2004; Bencharif & Dordas–Perpinya, 2020). فضلاً عن احتواء الحبيبات الدهنية بشكل رئيس على الجزيئات البروتينية عالية الكثافة (HDL) وهي جزيئات غير ذوابة في ممددات السائل المنوي بسبب الرابطة بينها وبين الفوسفيتين، كما أن لها تأثير سمي بنسب مختلفة في نطف الثدييات (Akal *et. al.,* 2014; Pace & Graham, 1974).

الجدول رقم (4): المقاييس الإحصائية الوصفية وقيمة (P) الاحتمالية لمجموعات الدراسة (EY, LyoP20%, LyoP40%, LyoP60%) فيما يتعلق بمتوسطات قيم الحركية المختلفة لجهاز الكازا ± الخطأ المعياري، حيث اعتبرت النتائج معنوية عند قيمة (P≤0.05).

الممدد المستخدم	EY	20% LyoP	40% LyoP	60% LyoP	p-value
VCL uM/s	31.28 ± 1.4	34.91 ± 2.5	34.25 ± 1.7	35.57 ± 1.9	0.459
VSL uM/s	15.44 ± 0.9	18.70 ± 1.7	18.26 ± 0.8	18.42 ± 1.6	0.334
VAP uM/s	19.03 ± 0.9	22.10 ± 1.6	21.61 ± 0.9	21.97 ± 1.58	0.359
ALH uM	0.61 ± 0.09	0.81 ± 0.10	0.76 ± 0.05	0.86 ± 0.29	0.732
BCF Hz	4.41 ± 0.09	4.21 ± 0.07	4.25 ± 0.02	4.94 ± 0.7	0.532
LIN %	52.23 ± 0.9	53.39 ± 1.0	54.35 ± 0.7	51.94 ± 1.7	0.485
STR %	70.57 ± 7.6	79.21 ± 1.10	80.45 ± 0.54	79.34 ± 1.68	0.306

نسبة النطف الحية والميتة، وسلامة الغشاء السيتوبلازمي:

وجد في دراستنا أن لنوع محلول التمديد تأثيراً معنوياً (P<0.05) في متوسطات نسب النطف الحية والميتة عند استخدام صبغة الأيوزين – نيكروزين، ومتوسطات نسبة النطف ذات الغشاء السيتوبلازمي السليم باستخدام محلول منخفض التوتر، حيث كانت النتيجة الأفضل عند استخدام بلازما صفار البيض المجفدة، ثم انخفضت في باقي الممددات كما هو موضح في الجدول رقم (5).

أشارت إحدى الدراسات إلى أن استعمال بلازما صفار البيض السائلة بنسبة 10% (35.17±0.95%) و15% (38.67±0.84%) و20% (40.50±0.62%) قد حسنت من حيوية النطف في ممدد الثيران المنوي بعد أن كانت (25.17 ± 0.79%) في ممدد صفار البيض التقليدي (Shah *et al.,* 2016)، وهذا يوافق ما حصلنا عليه في دراستنا. إذْ يفسر تحسن نسب الحيوية عند استعمال بلازما صفار البيض بدلاً عن صفار البيض التقليدي بقدرة بلازما الصفار على حماية غشاء النطفة بشكل أفضل، حيث أن بلازما صفار البيض غنية بجزيئات بروتينية منخفضة الكثافة (LDL) التي تمتلك قدرة عالية على الارتباط بالغشاء البلازمي للنطفة، مما يقلل من فقدان الفوسفوليبيدات أثناء عملية التجميد – الإذابة ويحد من تكوّن الجذور

الحرة وبيروكسيد الدهون (Amirat *et al.,* 2004). في المقابل، يحتوي الصفار الكامل على جزيئات بروتينية عالية الكثافة (HDL) ومواد حبيبية قد تتداخل مع سلامة الغشاء وتزيد من الإجهاد التأكسدي، وهو ما يفسر انخفاض نسب الحيوية عند استخدامه (Akhter *et al.,* 2011). وبالتالي فإن استبدال الصفار الكامل بالبلازما يحقق حماية أفضل للغشاء، ويحافظ على نفاذيته ووظائفه الحيوية، مما ينعكس في ارتفاع نسبة النطف الحية بعد التجميد–الإذابة. كما يفسر أيضاً الفرق الواضح بين الدراستين حيث أن شاه استخدم 20% من بلازما البيض و60% في دراستنا إلى أن اختلاف التركيز المستخدم بين الدراستين قد يفسر التباين في القيم المطلقة للحيوية، إذْ إن رفع نسبة بلازما صفار البيض إلى 60% في دراستنا قد وفر كمية أكبر من جزيئات الـ LDL ذات الدور الوقائي، مما عزز من قدرة الممدد على تثبيت الغشاء البلازمي للنطفة وتقليل الضرر الناتج عن التجميد–الإذابة، فضلاً عن اختلاف حساسية النطف بين الثيران والجاموس (Belala *et al.,* 2019; Dixit *et al.,* 2016).

يعتبر استخدام محلول منخفض التوتر في اختبار سلامة الغشاء السيتوبلازمي للنطف مهم جداً لمعرفة قدرة النطف على الاخصاب الناجح، إذْ أكد أوريلو وزملاؤه أن ضرر الغشاء السيتوبلازمي قد يؤدي إلى فشل النطف المجمدة على الإخصاب رغم امتلاكها معدلات حركية جيدة (Ollero *et al.,* 1998). إذْ تُعد قدرة النطفة على الانتفاخ عند تعرضها لوسط منخفض التوتر مؤشراً مهماً على سلامة الغشاء ووظيفته الحيوية، إذْ يعكس ذلك النقل الطبيعي للماء عبر الغشاء الخلوي، ويوفر مؤشراً عملياً لكفاءة الغشاء في المحافظة على النشاط الحيوي للنطفة وقدرتها على الإخصاب الناجح (Jeyendran *et al.,* 1984; Revell & Mrode, 1994). وافقت نتائجنا مع ما حصل عليه بلالا وزملاؤه عند استخدام بلازما البيض المجفدة في حماية نطف الكلاب المخزنة بالتجميد، إذْ وجد أن بلازما صفار البيض السائلة والمجفدة تحافظ على الغشاء السيتوبلازمي للنطف كما هو الحال عند استخدام الـ LDL، (3.21± 50.03%) (4.31 ± 52.98%) (4.43 ± 49.62%) على التوالي. حيث أن استخدام جزيئات الـ LDL لم يقدم أي فوائد إضافية على حركية النطف بعد الإذابة مقارنةً مع محلول التمديد المحتوي على بلازما صفار البيض المجفدة بغض النظر عن احتواء محلول التمديد على واقيات البرودة النفوذة كالغليسيرول أو الفوسفاتيديل كولين (Belala *et al.,* 2019; Dong *et al.,* 2011). إن حفظ النطف بالتجميد يؤدي إلى تحول الفوسفوليبيدات في الغشاء من الحالة السائلة المرنة إلى الحالة الصلبة. والذي يؤدي إلى تجمع البروتينات الغشائية بشكل غير عكوس، ويختل ترتيبها الطبيعي، بالتالي يصبح الغشاء أكثر صلابة وهشاشة ويفقد الغشاء قدرته على النقل المنظم للماء والأيونات والحفاظ على التوازن التناضحي (Ugur *et. al.,* 2019). هنا يأتي دور الجزيئات البروتينية المنخفضة الكثافة والموجودة في بلازما البيض المجفدة والتي نعمل على استبدال الفوسفوليبيدات التالفة الموجودة في أغشية النطف أثناء عملية التجميد والإذابة مما يحافظ على سلامة الغشاء (Qureshi *et al.,* 2014). كما وافقت دراستنا ما حصل عليه بدري وزملاؤه، عند مقارنة بلازما صفار البيض المجفدة بممدد صفار البيض التقليدي في تجميد السائل المنوي عند الخيول، حيث تفوقت بلازما صفار البيض المجفدة (1.54 ± 39.53%) على ممدد صفار البيض التقليدي (1.00 ± 37.10%) في حماية الغشاء

السيتوبلازمي للنطف (El–Badry *et al.,* 2015)، إذ تحفز الجزيئات الدهنية عالية الكثافة أنزيم الأكروسين الموجود في البلازما المنوية عند الثدييات، يؤدي التفعيل المسبق لأنزيم الأكروسين إلى تخريب الغشاء السيتوبلازمي للنطف مما يعطل وظيفتها الإخصابية وانخفاض في حيوية النطف (Chelucci *et al.,* 2015; Mehdipour *et al.,* 2018).

الجدول رقم (5): المقاييس الإحصائية الوصفية وقيمة (P) الاحتمالية لمجموعات الدراسة (EY, LyoP20%, LyoP40%, LyoP60%) فيما يتعلق بنسبة النطف الحية والميتة والنطف ذات الغشاء السيتوبلازمي السليم ± الخطأ المعياري، حيث اعتبرت النتائج معنوية عند قيمة (P≤0.05).

الممدد المستخدم	EY	20% LyoP	40% LyoP	60% LyoP	p-value
HOS test %	27.80 ± 0.7	30.30 ± 1.2	35.40 ± 0.38	50.28 ± 0.41	**0.004**
EOSIN-NIGROSIN %	30.42 ± 2.1	35.93 ± 5.3	36.83 ± 2.9	49.88 ± 0.56	**0.007**

الاستنتاجات والتوصيات:

يمكن من خلال النتائج المتحصل عليها استنتاج ما يأتي:

1- إن إضافة بلازما صفار البيض المجفدة بدلاً عن صفار البيض التقليدي قد حسنت من الحركية العامة والحركية الأمامية التقدمية، وباقي مؤشرات الحركية المحوسبة، ونسبة النطف الحية، وسلامة الغشاء السيتوبلازمي.

2- إن النتائج الأفضل في حيوية النطف، وسلامة الغشاء السيتوبلازمي، كانت في المجموعة الرابعة والتي تتمثل بإضافة 60% (وزن/حجم) من بلازما صفار البيض المجفدة بدلاً عن 20% (حجم/حجم) من صفار البيض العادي.

من خلال الاستنتاجات توصي هذه الدراسة بما يأتي:

1- ينصح باستبدال صفار البيض العادي بنسبة 20% (حجم/حجم) ببلازما صفار البيض المجفدة بنسبة 60% (وزن/حجم) في ممددات السائل المنوي الخاص بالثيران.

2- إنجاز أبحاث تتضمن استخدام بلازما صفار البيض المجفدة بنسب مختلفة في حماية نطف الثدييات المختلفة بعد التجميد والإذابة.

3- متابعة تطبيق هذه النتائج من خلال تجربة حقلية لإثبات الجدوى في الاستخدام العملي.

المراجع الأجنبية:

1. AKAL, E., KOÇYİĞİT, A., & SELÇUK, M. (2014). Role of low-density lipoproteins in semen preservation. Kocatepe Veterinary Journal, 7(1), 69–74.
2. Akhter, S., Ansari, M. S., Rakha, B. A., Andrabi, S. M. H., Khalid, M., & Ullah, N. (2011). Effect of low-density lipoproteins in extender on freezability and fertility of Buffalo (bubalus bubalis) bull semen. Theriogenology, 76(4), 759–764.
3. Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gérard, O., Courtens, J. L., & Anton, M. (2004). Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk ldl: A comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. Theriogenology, 61(5), 895–907.
4. Anton, M. (2007). Composition and structure of hen egg yolk. Bioactive Egg Compounds, 1–6.
5. Anton, M. (2013). Egg yolk: Structures, functionalities and Processes. Journal of the Science of Food and Agriculture, 93(12), 2871–2880.
6. Anton, M., Martinet, V., Dalgalarrondo, M., Beaumal, V., David-Briand, E., & Rabesona, H. (2003). Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. Food Chemistry, 83(2), 175–183.
7. Ariantie, O. S., Amrozi, A., Yusuf, T. L., Rochman, N. T., & Purwantara, B. (2021). The production of freeze-dried egg yolk powder and its effect on the quality of Garut Ram Liquid Semen. Jurnal Kedokteran Hewan - Indonesian Journal of Veterinary Sciences, 15(2), 37–46.
8. Bansal, A., Lale, S., & Goyal, M. (2011). Development of lyophilization cycle and effect of excipients on the stability of catalase during lyophilization. International Journal of Pharmaceutical Investigation, 1(4), 214–221.
9. Belala, R., Briand-Amirat, L., Martinot, A., Thorin, C., Michaud, S., Desherces, S., Youngs, C. R., & Bencharif, D. (2019). A comparison of liquid and lyophilized egg yolk plasma to low density lipoproteins for freezing of canine spermatozoa. Reproduction in Domestic Animals, 54(8), 1131–1138.
10. Bencharif, D., Amirat, L., Pascal, O., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M.-L., Barrière, P., Larrat, M., & Tainturier, D. (2010). The advantages of combining low-density lipoproteins with glutamine for cryopreservation of canine semen. Reproduction in Domestic Animals, 45(2), 189–200.
11. Bencharif, Djemil, & Dordas-Perpinya, M. (2020). Canine semen cryoconservation: Emerging data over the last 20 years. Reproduction in Domestic Animals, 55(S2), 61–65.
12. Bustani, G. S., & Baiee, F. H. (2021). Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. Veterinary World, 1220–1233.
13. Chelucci, S., Pasciu, V., Succu, S., Addis, D., Leoni, G. G., Manca, M. E., Naitana, S., & Berlinguer, F. (2015). Soybean lecithin–based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. Theriogenology, 83(6), 1064–1074.
14. Chen, Y., Foote, R. H., Tobback, C., Zhang, L., & Hough, S. (1993). Survival of bull spermatozoa seeded and frozen at different rates in egg yolk-tris and whole milk extenders. Journal of Dairy Science, 76(4), 1028–1034.
15. Corcini, C. D., Goularte, K. L., Bongalhardo, D. C., Lucia, T., Jardim, R. D., & Varela Junior, A. S. (2015). Effect of egg yolk plasma on dog sperm cryopreservation. Andrologia, 48(1), 114–115.
16. Dixit, S., Pandey, V., Swain, D. K., Nigam, R., Sharma, A., Sharma, D., Saxena, A., & Singh, P. (2016). Seminal Plasma and Sperm Membrane Proteins of Buffalo and Cattle Bulls: A Comparative Study. Buffalo Bulletin, 35(3), 291–297.
17. Dong, Q.-X., Rodenburg, S. E., Hill, D., & VandeVoort, C. A. (2011). The role of low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) in comparison with whole egg yolk for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. Asian Journal of Andrology, 13(3), 459–464.

18. El-Badry, D., Anwar, A., Rawash, Z., & Scholkamy, T. (2015). Effect of the addition of natural and lyophilized hen’s egg yolk, egg yolk plasma and LDL to semen extender on the freezability and DNA integrity of Arab stallion spermatozo. Zagazig Veterinary Journal, 43(1), 117–128.
19. Galmidi, B.-S., Orvieto, R., Zurgil, N., Deutsch, M., & Fixler, D. (2025). Overcoming Sperm Cell Survival Challenges Cryopreserved in Nanoliter Volumes.
20. García-López, N., Ollero, M., Muiño-Blanco, T., & Cebrián-Pérez, J. A. (1996). A dextran swim-up procedure for separation of highly motile and viable ram spermatozoa from seminal plasma. Theriogenology, 46(1), 141–151.
21. Hai, E., Li, B., Zhang, J., & Zhang, J. (2024). Sperm freezing damage: The role of Regulated Cell Death. Cell Death Discovery, 10(1).
22. Hu, J.-H., Li, Q.-W., Zan, L.-S., Jiang, Z.-L., An, J.-H., Wang, L.-Q., & Jia, Y.-H. (2010). The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing–thawing. Animal Reproduction Science, 117(1–2), 11–17.
23. Hula , N., & Marhitych , V. (1994). Role of sperm phospholipids in its fertilization ability. Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal, 66(1), 3–10.
24. Hussain Shah, S. A., Hassan Andrabi, S. M., Ahmed, H., & Qureshi, I. Z. (2017). Chicken egg yolk plasma in tris-citric acid extender improves the quality and fertility of cryopreserved water buffalo (bubalus bubalis) spermatozoa. Theriogenology, 89, 32–40.
25. Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., & Zaneveld, L. J. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. Reproduction, 70(1), 219–228.
26. Khalil, W. A., El-Harairy, M. A., Zeidan, A. E. B., Hassan, M. A. E., & Mohey-Elsaeed, O. (2018). Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and Ultrastructural Insights. International Journal of Veterinary Science and Medicine, 6(1), 49–56.
27. Layek, S. S., Mohanty, T. K., Kumaresan, A., & Parks, J. E. (2016). Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean-based extenders. Animal Reproduction Science, 172, 1–9.
28. Marcet, I., Sáez-Orviz, S., Rendueles, M., & Díaz, M. (2022). Egg yolk granules and phosvitin. recent advances in Food Technology and applications. LWT, 153, 112442.
29. MC BEE, L. E., & COTTERILL, O. J. (1979). Ion-exchange chromatography and electrophoresis of egg yolk proteins. Journal of Food Science, 44(3), 656–667.
30. Mehdipour, M., Daghigh Kia, H., Moghaddam, G., & Hamishehkar, H. (2018). Effect of egg yolk plasma and soybean lecithin on rooster frozen-thawed sperm quality and fertility. Theriogenology, 116, 89–94.
31. Moreno, D., Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Neira, A., Destrumelle, S., & Tainturier, D. (2013). Preliminary results: The advantages of low-density lipoproteins for the cryopreservation of equine semen. Journal of Equine Veterinary Science, 33(12), 1068–1075.
32. 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(6), 1695–1706.
33. Moustacas, V. S., Zaffalon, F. G., Lagares, M. A., Loaiza-Eccheverri, A. M., Varago, F. C., Neves, M. M., … Henry, M. (2011). Natural, but not lyophilized, low density lypoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, *75*, 300–307.
34. Murphy, E. M., O’Meara, C., Eivers, B., Lonergan, P., & Fair, S. (2018). Comparison of plant- and egg yolk-based semen diluents on in vitro sperm kinematics and in vivo fertility of frozen-thawed bull semen. Animal Reproduction Science, 191, 70–75.
35. Neves, M. M., Heneine, L. G. D., & Henry, M. (2014). Cryoprotection effectiveness of low density concentrations of natural and lyophilized LDL on canine spermatozoa. Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia, 66, 769–777.
36. Pace, M. M., & Graham, E. F. (1974). Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. Journal of Animal Science, 39(6), 1144–1149.

37. Phillips, P. H., & Lardy, H. A. (1940). A yolk-buffer pabulum for the preservation of Bull Semen. Journal of Dairy Science, 23(5), 399–404.
38. Pillet, E., Duchamp, G., Batellier, F., Beaumal, V., Anton, M., Desherces, S., Schmitt, E., & Magistrini, M. (2011). Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. Theriogenology, 75(1), 105–114.
39. Qureshi, M. S., & Rehman, F. U. (2014). Effect of Soybean Based Extenders on Sperm Parameters of Holstein- Friesian Bull During Liquid Storage at 4oC. Pakistan Journal of Zoology, 46(1), 185–189.
40. Raheja, N., Choudhary, S., Grewal, S., Sharma, N., & Kumar, N. (2018). A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. JOURNAL OF ENTOMOLOGY AND ZOOLOGY STUDIES, 6(3), 239–245.
41. Rauch, A. (2013). Cryopreservation of bovine semen in egg yolk-based extenders. University of Saskatchewan.
42. Revell, S. G., & Mrode, R. A. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. Animal Reproduction Science, 36(1–2), 77–86.
43. Sieme, H., Oldenhof, H., & Wolkers, W. F. (2016). Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. Animal Reproduction Science, 169, 2–5.
44. SINGH, A. K., KUMAR, A., & BISLA, A. (2021). Computer-assisted sperm analysis (CASA) in veterinary science: A Review. The Indian Journal of Animal Sciences, 91(6).
45. Ugur, M. R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. I., Purwantara, B., Kaya, A., & Memili, E. (2019). Advances in cryopreservation of Bull Sperm. Frontiers in Veterinary Science, 6.
46. Watson, P., & Martin, I. (1973). The influence of fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5 degrees C. Reproduction, 32(2).