

تحسين صفات السائل المنوي المخفف للماعز الشامي بإضافة الألبومين المصلي البقري

أسامة إبراهيم عزاوي وعمر جلال سليمان

فرع الجراحة وعلم تناسل الحيوان، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق

(الإستلام ٢١ كانون الاول ٢٠١٣؛ القبول ٩ كانون الثاني ٢٠١٤)

الخلاصة

تهدف الدراسة الحالية إلى تحسين صفات السائل المنوي المخفف بمخفف الترس للماعز الشامي بإضافة الألبومين المصلي البقري. استخدمت في الدراسة الحالية ستة ذكور من الماعز الشامي. تم جمع السائل المنوي باستعمال المهبل الصناعي وبمعدل قذفة واحدة من كل ذكر أسبوعياً ضمن فترة الموسم التناسلي من ٢٠١٢/١٠/١١ إلى ٢٠١٢/١٢/١١. تم في هذه الدراسة استعمال مخفف الترس - فركتوز - صفار البيض بنسبة ٢,٥% والمخفف الثاني الترس - فركتوز - صفار البيض ٢,٥% مع ١% من الألبومين المصلي البقري. تم تبريد السائل المنوي المخفف تدريجياً وخزنت في درجة حرارة ٥°C. تم إجراء الفحص المختبري على المنوي المخفف كل ٢٤ ساعة من الخزن، وإلى الساعة ١٤٤. وتضمنت هذه الفحوصات نسبة النطف الحية ونسبة التشوهات الثانوية للنطف ونسبة تشوهات قنوسات النطف وحساب الحركة التقدمية للنطف باستخدام جهاز تحليل السائل لمنوي بمساعدة الحاسوب. لقد أظهرت نتائج الدراسة أن إضافة الألبومين المصلي البقري مع صفار البيض إلى مخففات السائل المنوي لذكور الماعز أدى إلى تحسين صفات السائل المنوي (نسبة النطف الحية، سلامة القنوس، الشكل الطبيعي للنطف، والحركة التقدمية للنطف) مقارنة مع المخفف الحاوي على صفار البيض فقط عند مستوى معنوية ($P < 0,05$). يستنتج من الدراسة الحالية إمكانية خزن السائل المنوي المخفف والمبرد لذكور الماعز الشامي لأكثر من ستة أيام وبنسبة نطف حية أكثر من ٥٠% ونسبة حركة تقدمية كلية للنطف أكثر من ٤٠% عند إضافة الألبومين المصلي البقري إلى مخفف الترس وهذا ما لم تتوصل إليه أية دراسة سابقة.

Improvement of the Shami goat semen quality by adding bovine serum albumin

O.I. Azawi and O.J. Salman

Department of Surgery and Theriogenology, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq

Abstract

The present study was aimed to improve the quality of Shami goat semen diluted with Tris diluent by adding bovine serum albumin. In the current study, six male goats were used. Semen was collected using artificial vagina of one ejaculate per week of every male included in this study. This study was performed during the breeding season from 10 \ 2012 to 12 \ 2012. In this study, two semen diluents were use first; Tris- fructose- egg yolk 2.5% and second Tris - fructose - 2.5% egg yolk with 1% of bovine serum albumin. Diluted semen samples were cooled gradually and stored at 5 ° C. Cooled diluted semen samples were examined every 24 h of storage to 144 h. These tests includes the proportion of live sperm and the percentage of secondary abnormalities of the sperm, the percentage of sperm acrosomal defects and percentage of progressive motility using a computer-aided sperm analysis. These results showed that the addition of bovine serum albumin with egg yolk to semen of male goats led to improved qualities of semen significantly ($P < 0.05$) including the proportion of live sperm and the percentage of secondary abnormalities of the sperm, the percentage of sperm acrosomal defects and percentage of progressive motility. It could be concluded from the results of the current study, the possibility of storing goat semen for more than six days with alive sperm of more than 50% and the percentage of the progressive motility of more than 40% when adding bovine albumin serum to dilute goat semen at 1% level and this result has not reached by any previous study.

Available online at <http://www.vetmedmosul.org/ijvs>

المقدمة

التحطم والتمزق خلال عملية التجميد والإذابة للسائل المنوي (14). وأثبتت إحدى الدراسات (15) أن الألبومين المصلي البقري يمكن أن يكون بديلاً عن صفار البيض في مخففات السائل المنوي (للكباش) وذكر الباحث نفسه بأن الألبومين المصلي البقري زاد من حيوية وحركة خلايا نطف الكباش بعد عملية التجميد والإذابة. كما أثبت العالمان Uysal and Bucak (16) أن حيوية النطف وسلامتها بقيت جيدة بعد التجميد وإذابة السائل المنوي المخفف (للكباش) بعد إضافة ٢٠ ملغم/مل من الألبومين المصلي البقري. وذكر الباحث Gadea (17) أن الألبومين المصلي البقري أستطاع أن يحمي النطف من صدمة البرودة عند إضافته للمخففات. وفي دراسة أجريت على السائل المنوي للخيل وجد أن الألبومين المصلي البقري حافظ على النطف وثبط عملية بيروكسدة الدهون (18).

ونظراً للأهمية الكبيرة في تخفيف السائل المنوي للماعز، فقد اقترحت هذه الدراسة والتي تهدف إلى تحسين صفات وحيوية المني المخفف بالترس بإضافة الألبومين المصلي البقري.

المواد وطرائق العمل

أجريت هذه الدراسة في مختبر التلقيح الاصطناعي، فرع الجراحة وعلم تناسل الحيوان كلية الطب البيطري/جامعة الموصل للفترة من ٢٠١٢-١٠-١ إلى ٢٠١٢-١٢-١ ضمن الموسم التناسلي وسبقت الدراسة تدريب ذكور الماعز مدة شهر على جمع السائل المنوي باستعمال المهبل الاصطناعي. استخدمت في هذه الدراسة ستة ذكور من (الماعز الشامي) تراوحت أعمارها بين سنتين إلى ثلاث سنوات وبمعدل أوزان تراوحت بين ٣٥ - ٤٥ كغم، وتم إجراء الفحوصات السريرية عليها للتأكد من خلوها من الأمراض المعدية. تم جمع السائل المنوي من ذكور الماعز باستخدام المهبل الصناعي وبواقع مرة واحدة من كل ذكر ماعز أسبوعياً.

وتم إهمال العينات ذات التركيز الأقل من 1×10^9 نطفة/مل، وكذلك النطف ذات الحركة الفردية الأقل من ٨٠ %، والنطف ذات الحركة الجماعية الأقل من ٨٠ %، وكذلك أهملت العينات التي تحتوي على نسبة تشوهات أكثر من ١٠ %. تم فحص الحركة التقدمية للنطف في عينات السائل المنوي باستخدام جهاز تحليل السائل المنوي بمساعدة الحاسوب Computer Assisted Semen Analyzer (CASA)، إذ تم وضع قطرة صغيرة (١٠ مايكرو لتر) من السائل المنوي المخفف على شريحة زجاجية خاصة بالمجهر الضوئي، وتم وضع غطاء الشريحة عليها، وفحصت تحت العدسة ذات القوة $10 \times$ في المجهر الخاص بجهاز تحليل السائل المنوي، وتم أيضاً ضبط حرارة المسرح الدافئ على 37°C .

تم في هذه الدراسة استعمال مخفف الترس - فركتوز - صفار البيض، والذي يتكون من: ٢,٤٢ غم من الترس (tri-) و ١,٢ غم من حامض (hydroxy methyl amino methane)،

من المعروف أن أغلب المخففات تحتوي على صفار البيض، و تكمن أهمية صفار البيض في احتوائه على مركبات مثل البروتين الدهني قليل الكثافة (Low-density Lipoprotein (LDL) (1)، إذ يحمي هذا البروتين الغشاء الخلوي للنطف من التلف أثناء التبريد والتجميد لذا يعد صفار البيض من أهم العناصر وأكثرها استخداماً وشيوعاً ضمن مخففات السائل المنوي (2). ومن أهم المشاكل التي تواجه عملية تخفيف السائل المنوي لذكور الماعز ولاسيما المخففات التي تحتوي على صفار البيض، هو احتواء البلازما المنوية لذكور الماعز على إنزيم يفرز من الغدة البصلية الأكليلية (3،4) والذي يعمل على تجلط صفار البيض وتحلله وبالتالي إنتاج مادة اللايسوليسئين السامة والقاتلة للنطف، ويعرف هذا الأنزيم بالإنزيم المجلط لصفار البيض Egg Yolk-coagulating enzyme (EYCE)، أو phospholipase A. (5,4) ويعد الباحث Roy (6) أول من سجل التفاعل الضار لهذا الأنزيم مع صفار البيض، إذ لاحظ أنه عند إزالة البلازما المنوية من السائل المنوي لذكور الماعز وتخفيف النطف بمخفف يحتوي على صفار البيض حافظت النطف على حيويتها وحركتها، وأما عند تخفيف السائل المنوي من دون إزالة البلازما المنوية بمخفف يحتوي على صفار البيض لوحظ تجلط صفار البيض، وموت النطف (5,4). وعرف هذا الأنزيم على أنه إنزيم حال للشحوم الفسفورية من نوع A (Phospholipase A)، إذ صنف هذا الأنزيم تحت عائلة الأنزيمات البنكرياسية والتي تعمل بوصفها وسيطاً لتحلل الليسيثين إلى أحماض دهنية ولايسوليسئين ذو التأثير الضار والقاتل للنطف من خلال تحطيم الغشاء الخلوي للنطفة (7,5)، ويؤدي هذا التحطيم إلى تحفيز فعاليات القلنسوة (8) ويعمل أيضاً على تكثيف (الكروماتين) السام للنطف (9,5)، وتختلف سمية الأنزيم المجلط لصفار البيض باختلاف كمية التحلل الذي يسببه، وتتأثر هذه السمية باختلاف الأس الهيدروجيني، وتركيز الأنزيم في البلازما المنوية، ودرجة الحرارة كما أنها تتأثر بموسم جمع السائل المنوي (4). وذكر الباحث Leboeuf (4) أن فعالية الأنزيم المجلط لصفار البيض تنوقف عند درجة حرارة 60°C ومدة ٢ - ٥ دقائق، وذكرت بعض الدراسات (10,4) أن غسل النطف ولاسيما قبل تخفيف السائل المنوي قد تؤدي إلى بقاء النطف بعد تخزينها في 4°C لمدة أطول من السائل المنوي غير المغسول، وبينت بحوث عديدة (12,11,5) أن غسل السائل المنوي وإزالة البلازما المنوية كان ضرورياً قبل تخفيف السائل المنوي المجمد، وذلك لزيادة حركة النطف بعد الإذابة وتقليل تشوهات القلنسوة.

إن الألبومين المصلي البقري بروتين دهني ذو كثافة قليلة ووزن جزيئي عال يصل إلى ٦٩٠٠٠ و ذو عدد ذري ٦٠٧ كما إن لهذه المادة قابلية للذوبان في الماء (13). من أهم وظائف الألبومين المصلي البقري إزالة الجذور الحرة المتكونة من خلال الكرب التأكسدي، فضلاً عن كونها تحمي غشاء خلايا النطف من

جدول ١: النسبة المئوية للنطف الحية (معدل±الخطأ القياسي)

نوع الأضافة		الوقت (ساعة)
مخفف الترس صفار البيض ٢,٥ + الألبومين المصلي البقري ١ %	مخفف الترس صفار البيض ٢,٥ % (السيطرة)	
* ١,٢±٨٨,٠	١,١±٨٣,٣	٠
* ١,١±٨٤,٢	١,٢±٧٨,١	٢٤
* ١±٨٠,٧	١,٢±٧٣,٥	٤٨
* ١±٧٦,٧	١,٩±٦٧,٤	٧٢
* ١±٧٢,٠	١,٥±٦٤,٤	٩٦
* ١,١±٦٦,٤	١,٤±٥٩,٢	١٢٠
* ١,٤±٥٩,٧	١,٤±٥٠,٨	١٤٤

* فرق معنوي (P<0.05) عند المقارنة مع مجموعة السيطرة.

جدول ٢: النسبة المئوية لتشوهات النطف (معدل±الخطأ القياسي)

نوع الأضافة		الوقت (ساعة)
مخفف الترس صفار البيض ٢,٥ + الألبومين المصلي البقري ١ %	مخفف الترس صفار البيض ٢,٥ % (السيطرة)	
* ٠,١±٢,٢	٠,٢±٣,٢	٠
* ٠,٢±٤,١	٠,٣±٥,٨	٢٤
* ٠,٣±٦,٥	٠,٣±٨,٦	٤٨
* ٠,٦±٩,٠	٠,٧±١٢,٦	٧٢
* ٠,٨±١٢,٠	٠,٦±١٥,٣	٩٦
* ٠,٩±١٥,٦	٠,٧±١٩,٣	١٢٠
* ٠,٩±١٩,٦	٠,٦±٢٥,٢	١٤٤

* فرق معنوي (P<0.05) عند المقارنة مع مجموعة السيطرة.

جدول ٣: النسبة المئوية لتشوهات القلتسوة (معدل±الخطأ القياسي)

نوع الأضافة		الوقت (ساعة)
مخفف الترس صفار البيض ٢,٥ + الألبومين المصلي البقري ١ %	مخفف الترس صفار البيض ٢,٥ % (السيطرة)	
* ٠,١±١,٤	٠,١±٢,١	٠
* ٠,١±٣,٠	٠,٢±٤,٤	٢٤
* ٠,٢±٥,١	٠,٣±٦,٥	٤٨
* ٠,٤±٧,٢	٠,٦±٩,٨	٧٢
* ٠,٥±٩,٧	٠,٦±١٢,٣	٩٦
* ٠,٥±١٢,٧	٠,٦±١٥,٩	١٢٠
* ٠,٦±١٦,٣	٠,٦±٢٠,٥	١٤٤

* فرق معنوي (P<0.05) عند المقارنة مع مجموعة السيطرة.

الستريك، و ١,٥ غم من الفركتوز، وأستخدم ١٠٠٠٠٠ وحدة دولية من البنسلين و ١٠٠ ملغم من الستربتومايسين ثم أضيف ١٠٠ مل من الماء المقطر المنزوع الأيونات (19) ومن ثم تم تقسيم المخفف إلى قسمين وأضيف إلى كل قسم المواد الأتية وكما يأتي: القسم الأول (مجموعة السيطرة): أضيف ٢,٥ % من صفار البيض إلى المخفف فقط، القسم الثاني: أضيف ٢,٥ % من صفار البيض إلى المخفف مع ١ % من الألبومين المصلي البقري.

تم تخفيف السائل المنوي بعد جمع مباشرة باستعمال طريقة التخفيف ١ : ٢٠ وبصورة تدريجية لتجنب حصول صدمة تغيير الضغط التناذي. إذ تم تقسيم السائل المنوي المجموع على ثمانية أقسام، وكل قسم يحتوي على ٢ مل ووضع لكل قسم الكمية نفسها من المخفف المخصص (١:١ ثم ١:٢ ثم ١:٤) وهكذا إلى أن وصلت نسبة التخفيف ٢٠ : ١ (مخفف : سائل منوي). بعدها تم حفظ السائل المنوي المخفف في الثلجة (درجة حرارة ٥٥ م)، وحفظ السائل المنوي في الثلجة مدة ستة أيام إذ كانت تجرى عليه الفحوصات الحيوية كل ٢٤ ساعة إلى اليوم السادس.

تم استخدام التحليل الإحصائي للبيانات وذلك باستخراج المتوسط والخطأ القياسي وتم استخدام اختبار t (Sigma stat, Jandel scientific software V3.1 Inc., Richmond, CA, USA, 2004).

النتائج

بينت نتائج هذه الدراسة أن أعلى نسبة للنطف الحية كانت بعد التخفيف مباشرة وقد وجد اختلاف معنوي (P<0.05) بين مخفف ترس المضاف إليه الألبومين المصلي البقري ومخفف ترس بدون الألبومين المصلي البقري (الجدول ١). إذ بين الجدول ١ تفوق مخفف ترس المضاف إليه صفار البيض ٢,٥ % مع الألبومين المصلي البقري ١ % وبفارق معنوي (P<0.05) على مجموعة السيطرة خلال فترات الخزن وحتى اليوم السادس.

وعند حساب نسبة تشوهات النطف وكما في الجدول ٢ وجد تفوق المخفف الترس المضاف إليه الألبومين المصلي البقري على مخفف ترس الخالي من الألبومين المصلي البقري (مجموعة السيطرة) في المحافظة على الشكل الطبيعي للنطف وبفارق معنوي (P<0.05).

وعند حساب نسبة تشوهات القلتسوة للنطف وجد تفوق مخفف ترس الحاوي على الألبومين المصلي البقري مع صفار البيض على مخفف ترس الحاوي على صفار البيض بنسبة ٢,٥ % (السيطرة) في المحافظة على سلامة القلتسوات للنطف خلال فترات الخزن وحتى الساعة ١٤٤ وبفارق معنوي (P<0.05) (الجدول ٣).

تكوين الأحماض الدهنية ذات التأثير السلبي على النطف، وهذا يتفق مع ما توصل إليه Matsuoka (15) إذ وجد أن استبدال صفار البيض بالألبومين المصلي البقري (BSA) في السائل المنوي المخفف للكباش قد عزز حركة النطف وحيويتها بعد عملية التجميد والتذويب.

وقد أشار الباحث Matsuoka (15) إلى تحسن في حيوية النطف وسلامتها عندما أضاف الألبومين المصلي البقري وبنسبة ١٠ ملغم/مل إلى السائل المنوي المبرد والمحفوظ في درجة حرارة ٥°م للكباش العواسي المحلية.

وقد يعزى السبب في بقاء حيوية النطف مدة أطول إلى وجود صفار البيض والألبومين المصلي البقري معا إذ يحتوي صفار البيض على مركبات تحمي الغشاء الخلوي للنطف من التلف أثناء التبريد والتجميد مثل البروتين الدهني قليل الكثافة (LDL) وكذلك وجود الألبومين المصلي البقري الذي يعد مادة مضادة للأكسدة تمنع تكون الجذور الحرة، وهذا يتفق مع العديد من الدراسات لإضافة مضادات الأكسدة إلى السائل المنوي في الكباش (22,23). إن إضافة الألبومين المصلي البقري إلى مخففات السائل المنوي له تأثير إيجابي على حركة وحيوية النطف. تعتبر الدراسة الحالية الأولى من نوعها في العراق في إضافة الألبومين المصلي البقري إلى مخففات السائل المنوي المبرد والمحفوظ في درجة حرارة ٥°م في الماعز.

المصادر

1. Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method. cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. Theriogenology 2002;57:1695-1706.
2. Nordstoga A, Söderquist L, Ådnøy T, Paulenz H. Fertility results after vaginal deposition of frozen-thawed buck semen diluted with two different extenders using one- or two-step procedures. Reprod Domest Anim. 2011;46: 82- 86.
3. Pellicer-Rubio MT, Combarou Y. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbo urethral lipase BUSgp60. J Repro Fertil 1998;112:95-105.
4. Leboeuf B, Restall B, Salamon S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. Anim Repro Sci. 2000; 62:113-141.
5. Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. Small Rumin Res. 2006;63:215-25.
6. Roy A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. Nature. 1957;179:318-319.
7. Dlgadillo JA, Flores JA, Veliz FG, Hernandez HF, Durate G, Vielma J, Ponindron P, Chemineau P, Malpoux B. Inuction of sexual activity in lactating an ovulatory females goat using male goat treated with artificial only days. J Anim Sci. 2002;80:2680-2780.
8. Upreti GC, Hall EL, Koppens D, Oliver JE, Vishwanath R. Studies on the measurement of phospholipase A2 (PLA2) and PLA2 inhibitor activities in ram semen. Anim Reprod Sci. 1999;56:107-121.
9. Sawyer DE, Brown DB. The use on an in vitro sperm activation assay to detect chemically induced damage of human sperm nuclei. Repro Toxicol. 1995;9:351-357.
10. Paulenz H, Soderquist L, Adnoy T, Soltun K, Saether PA, Fjellsoy K R. Effect of cervical and vaginal insemination with liquid semen stored at room temperature on fertility of goats. Anim Repro Sci. 2005;86:109-117.

ووجد عند حساب نسبة الحركة التقدمية الكلية للنطف وكما في الجدول ٤ تفوق مخفف ترس الحاوي على الألبومين المصلي البقري على مخفف ترس الخالي من الألبومين المصلي البقري (مجموعة السيطرة) وبفارق معنوي خلال فترات الخزن.

جدول ٤: النسبة المئوية للحركة التقدمية الكلية للنطف (معدل ± الخطأ القياسي)

الوقت (ساعة)	مخفف الترس صفار البيض ٢,٥% + الألبومين المصلي البقري ١%	مخفف الترس صفار البيض ٢,٥% (السيطرة)	نوع الأضافة
٠	٢,١±٨٥,١ *	٤,٧±٧٧,٢	مخفف الترس صفار البيض
٢٤	٢,٣±٧٧,٣ *	٤,٧±٧٠,٧	مخفف الترس صفار البيض
٤٨	٢,٣±٧٠,٦ *	٤,٧±٦٢,٩	مخفف الترس صفار البيض
٧٢	٣ ± ٦٣,٧ *	٥ ± ٥٦,٤	مخفف الترس صفار البيض
٩٦	٣,١±٥٧,٦ *	٤,٥±٥٤,٩	مخفف الترس صفار البيض
١٢٠	٢,٨±٤٩,٥ *	٤,١±٤٦,٠	مخفف الترس صفار البيض
١٤٤	٣,١±٤١,٨ *	٣,٧±٣٠,٩	مخفف الترس صفار البيض

* فرق معنوي (P<0.05) عند المقارنة مع مجموعة السيطرة.

المناقشة

تعد عملية تخفيف السائل المنوي من أهم الطرائق المستخدمة لزيادة كمية السائل المنوي، وذلك لاستخدامه في تلقيح أكبر عدد من الإناث (5,4)، كما ويؤدي تخفيف السائل المنوي إلى إرتفاع نسبة خصوبة ذلك السائل وارتفاع حيوية النطف من خلال زيادة كمية المواد الأساسية لتغذية النطف (20).

بينت نتائج الدراسة تفوق مخفف الترس الحاوي على صفار البيض بنسبة ٢,٥% والألبومين المصلي البقري بنسبة ١% في المحافظة على سلامة النطف وحيويتها (نسبة النطف الحية، ونسبة سلامة فلتسوات النطف، والشكل الطبيعي للنطف، والحركة التقدمية الكلية للنطف) على المخفف الحاوي على صفار البيض بنسبة ٢,٥% (السيطرة)، وكان التفوق معنويًا (P<0.05) وقد يعود السبب إلى أن إضافة الألبومين المصلي البقري مع صفار البيض يمنع بيروكسدة دهون الغشاء الخلوي للنطف والذي يؤدي إلى تلازن النطف، وهذا يتفق مع دراسة أجريت على الخيول (18) إذ وجد أن الألبومين المصلي البقري عمل على حماية النطف من صدمة البرودة وهذا ما ذكره Gadea (17) من أنه يمنع أيضا تكون الجذور الحرة، إذ يعمل بوصفه مضاد أكسدة، وهذه النتيجة تتفق مع Lewis (21) في الإنسان ومع Uysal and Bucak (16) في الكباش، ويعمل أيضا على تقليل التأثير الضار لمادة اللايسو ليسيثين والمتكونة من مادة الليسيثين الموجودة في صفار البيض من تفاعل صفار البيض مع الأنزيم المحلط لصفار البيض والمفرز من الغدة البصلية الأكليلية، وكذلك يقلل من

- effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*. 2004;62: 690-701.
18. Klem ME, Kreider JL, Pruitt JB, Potter GD. Motility and fertility of equine spermatozoa extended in bovine serum albumin and sucrose. *Theriogenology*. 1986;26:569-576.
 19. Azawi OI, Al-Dahash SYA, Juma FT. Effect of different diluents on Shami goat semen. *Small Rum Res*. 1993;9:347-352.
 20. Chemineau P, Baril G, Leboeuf B, Maurel MC, Roy F, Pellicer-Rubio M, Malpoux B, Cognie Y. Implications of recent advances in reproductive physiology for reproductive management of goats. *J Repro Fertil*. 1999;Suppl54:129-142.
 21. Lewis SEM, Sterling ESL, Young IS, Thompson W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril*. 1997;67:142-147.
 22. Maxwell WMC, Stojanov T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod Fertil Dev*. 1996;8:1013-1020.
 23. Mara L, Accardo C, Pilichi S, Dattena M, Chessa F, Chessa B, Branca A, Cappai P. Benefits of TEMPOL on ram semen motility and in vitro fertility: a preliminary study. *Theriogenology*. 2005; 63:2243-2253.
 11. Ritar AJ, Salamon S. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust J Biol Sci*. 1982;35: 305-312..
 12. Salvador I, Viudes-De-Castro MP, Yaniz J, Gomez EA, Silvestre MA. Effect of different extenders and washing of seminal plasma on buck semen storage at 5 degrees C. *J Anim Vet Adv*. 2007;6: 272-277.
 13. Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, Magistrini, M. Advances in cooled semen technology. *Anim Repro Sci*. 2001;68:181-190.
 14. Uysal O, Korkmaz T, Tosun H. Effect of bovine serum albumine on freezing of canine semen. *Indian Vet J*. 2005;82:97-98.
 15. Matsuoka T, Imai H, Kohno H, Fukui Y. Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. *J Reprod Dev*. 2006;52: 675-683.
 16. Uysal O, Bucak MN. Effect of oxidized Glutathione, Bovine Serum Albumin, Lycopene on the Quality of Frozen-Thawed Ram Semen. *Acta Vet Brno*. 2007;76: 383-390.
 17. Gadea J, Selles E, Marco MA, Coy P, Matas C, Romar R, Ruiz S. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: