

ГЕНЕТИКА, СЕЛЕКЦИЯ И РЕПРОДУКЦИЯ**ВЛИЯНИЕ НА РАЗЛИЧНИ АНТИОКСИДАНТИ ВЪРХУ
ОКСИДАТИВНИ СТРЕС ИНДИКАТОРИ И КАЧЕСТВОТО НА
ЗАМРАЗЕНА - РАЗМРАЗЕНА СЕМЕННА ТЕЧНОСТ ОТ БИЦИ****Янчо Тодоров, Таня Тодорова***Институт по животновъдни науки – Костинброд***РЕЗЮМЕ**

Криоконсервацията е свързана с образуването на реактивни кислородни субстанции (ROS), които водят до липидна пероксидация на спермалната мембрана, което от своя страна води до загуба на подвижността и жизнеспособността на сперматозоидите и плодовитостта.

Целта на проучването е да се изследва ефектът на два антиоксиданта – редуциран глутатион (GSH) и говежди серумен албумин (BSA) върху стандартните показатели на качеството на спермата (подвижността, акрозомната и общи аномалии, тест HOST), ендогенните антиоксидантни ензимни активности и оплодителните качества на замразена - размразена сперма от бик.

Използвани са 18 еякулата от три аборигенни бика, получени чрез изкуствена вагина. Еякулатите за девет проби се разреждат с разреждател Bioxcell®, обогатен с антиоксиданти, включително BSA (5 mg/ml), GSH (2 mM) и разреждател, който не съдържа антиоксиданти (контрола). Добавянето на антиоксиданти води до по-ниски нива на акрозомни аномалии и общи нарушения. Супероксид дисмутазната (SOD) активност във всички експериментални групи е по-ниска от контролната група. Освен това, BSA увеличава активността на каталазата след процеса на замразяване - размразяване.

Ключови думи: антиоксиданти, семенна течност, бици

Криоконсервацията на семенна течност води до конкретни възможности за опазването и широкото разпространение на ценни генетични ресурси чрез банките за семенна течност, гаранция за постоянни търговски доставки, както и сътрудничество в програми за породно подобряване чрез използване на методите за изкуствено осеменяване.

Някои от проблемите, възникнали при прилагане на изкуствено осеменяване при свине, овце и екзотични видове, включват нарушена подвижност, мембранния интегритет и фертилизационния потенциал на сперматозоидите по време на/и след криоконсервация, преждевременно активиране в женския генитален тракт и променени мембранни реакции към физиологични стимули на спер-

матозоидите, които оцеляват след процеса на замразяване - размразяване (Viswanath and Shannon, 2000). Добре известно е, че фосфолипидите в плазмената мембрана на сперматозоидите претърпяват пероксидация, което води до образуването на реактивни кислородни субстанции (ROS, а именно, супероксид анионен радикал, водороден пероксид) и липидни пероксиди (Alvarez and Storey, 2005). Прекомерното производство на ROS от незрели и абнормални сперматозоиди и от обработка на спермата (например разреждане, замразяване/размразяване), придружено от слабо неутрализиране и ниски антиоксидантни концентрации в семенната плазма и разреждателя, индуцират оксидативен стрес (Sikka, 2004). Според Trinchero et al. (1990),

замразени - размразени сперматозоиди от бик се пероксирират по-лесно, в сравнение със свежи. Освен това, криоконсервацията на сперма от бик води до намаляване на сперматозоидните вътреклетъчни антиоксиданти като редуциран глутатион (GSH) и супероксид дисмутаза (SOD).

Антиоксидантната система, включваща GSH, GSH-PX, CAT и SOD, е описана като защитен механизъм срещу липидна пероксидация (LPO) на спермата и е важна за поддържането на подвижността и жизнеспособността на сперматозоидите (Gadea et al., 2004 г.). Този антиоксидантен капацитет в сперматозоидите може да се окаже недостатъчен за предотвратяване на LPO по време на процеса на замразяване - размразяване. В това отношение при сперматозоидите от бозайници липсва съществен цитоплазмен компонент, който съдържа антиоксиданти, които неутрализират вредното въздействие на ROS и LPO (Peris et al., 2007).

Тиолите като GSH и GSSG са голям клас антиоксиданти. Добре известно е, че GSH е в състояние да реагира с много ROS директно и е ко-фактор за глутатион пероксидазата, който катализира редуцираната на хидропероксида и токсични H_2O_2 (Bilodeau et al., 2001).

Оксидираната форма на глутатион е частично регенерирана от GSH чрез действието на ензима глутатион редуктаза и секретирани от клетката, когато капацитетът на глутатион редуктаза е превишен. Клетките от бозайници могат да утилизират само тиолови съединения, като редуциран и окислен глутатион, които проникват лесно през клетъчната мембрана, подобрявайки биосинтеза на вътреклетъчния както *in vitro*, така и *in vivo*, и защитата на мембранните липиди и протеини чрез директна елиминация на радикалите. Освен това е известно, че говеждият серумен албумин запазва подвижността на сперматозоидите и целостта на плазмената мембрана и акрозомата срещу температурния шок по време на процеса на замразяване/размразяване. Той може също да подпомогне оцеляването на сперматозоидите в репродуктивния тракт на кравата преди оплождане.

Целта на това изследване е да се определи ефектът на антиоксидантите – редуциран глутатион (GSH) и говежди серумен албумин (BSA), върху стандартни показатели на спермата (подвижност, акрозомната и общите аномалии, хипоосмотичен тест – HOST), ендогенните антиоксидантни ензимни активности и оплодителните качества на замразена - размразена семенна течност от бик.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Животни и получаване на семенен материал

Бяха използвани семенни проби от три аборигенни бика на възраст 3–4 години. Общо 66 еякулати са получени два пъти седмично от биките с помощта на изкуствена вагина. Използвани са само еякулати, съдържащи сперматозоиди с >80% прогресивна подвижност и концентрации от $1,0 \times 10^9$ сперматозоиди/ml. В проучването са включени 18 еякулата от всеки бик. Първият и вторият еякулат от един и същи бик се смесват. Веднага след получаването им еякулатите бяха потопени във водна баня при 34°C до преценката им в лабораторията. Преценката се извършва в рамките на 20 минути. Изследването е повторено девет пъти.

Обработка и оценка на семенната течност

Обемът на еякулата се измерва в конична епруветка (0,1 ml деления) и концентрацията на спермата се определя с камера на Тома. Подвижността на сперматозоидите се определя чрез фазово-контрастна микроскопия ($\times 200$). Търговският разреждател (Bioxcell®, IMV) се използва като базов разреждател при замразяване. Всеки еякулат се разделя на четири равни експериментални групи и се разрежда до крайна концентрация от $6,0 \times 10^7$ /ml сперматозоиди, като базовият разреждател съдържа BSA (5 mg/ml), GSH (2 mM) и без антиоксиданти (контрола). Тези антиоксиданти са добавени директно към базовия разреждател. Разредените проби сперма се зареждат в

0,25 ml пайети и се охлажда до 4°C за 2 часа, замразяват се при зададена скорост 3°C/мин. от +4 до -10°C; 40°C/мин. от -10°C до -100°C; 20°C/мин. от -100 до -140°C в автоматичен замразител. След това пайетите се потопяват в течен азот (-196°C) до размразяването им. Замразените пайети се размразяват при 37°C във водна баня за 20 секунди, непосредствено преди употреба. Подвижността им е преценена с помощта на фазово-контрастен микроскоп. Върху предметно стъкло се поставя 5 µl капка и се покрива с покривно стъкло. Мотилитетът се определя в три микроскопски полета за всяка спермална проба. Средната стойност на три последователни оценки се записва като оценка на крайната подвижност (Bearden and Fuquay, 2000).

За оценка на аномалии при сперматозоидите най-малко три капки от всяка проба се добавят към епруветки Епендорф, съдържащи 1 ml разтвор на Napsock (62,5 ml формалин (37%), 150 ml физиологичен разтвор, 150 ml буферен разтвор и 500 ml бидестилирана вода (Schafer and Holzman, 2000). Една капка от тази смес се поставя върху предметно стъкло и се покрива с покривно стъкло. Процентите на акрозомната и общите аномалии (акрозомни аномалии, откъснати глави, абнормална шийка и опашни дефекти) бяха определени чрез преброяване на 400 сперматозоиди под фазово-контрастен микроскоп ($\times 1000$ увеличение, маслена имерсия).

Хипоосмотичният тест се използва за оценка на функционалната цялост на сперматозоидните мембрани. Това се извършва чрез инкубиране на 30 µl сперма с 300 µl хипоосмотичен разтвор от 100 mOsm при 37°C в продължение на 60 мин. След инкубацията 0,2 ml от сместа се поставят на предметно стъкло върху подгриваща масичка. Двеста сперматозоида се изследват с фазово-контрастен микроскоп ($\times 400$ пъти) и се отчита дали имат подути или S-образно завити опашки.

Биохимични анализи бяха проведени в проби от спермата веднага след размразяване и след центрофугиране и промиване. Една аликвотна част (500 µl) сперма от всяка проба се центрофугира при 800 g в продължение на 10 минути и пелета се отделя и се промива чрез ресуспендиране в PBS и центрофугиране (три пъти). След последното центрофугиране 1 ml дейонизирана вода се добавя към сперматозоидите. Пробите се размразяват преди анализите за липидна пероксидазна активност и антиоксидантни ензимни активности (Dandekar et al., 2002).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Спермалните характеристики на замразени-размразени сперматозоиди от бик са показани в табл. 1. Антиоксидантите под-

Таблица 1. Процент на подвижността, акрозомни аномалии, общо аномалии и хипоосмотичен тест в замразено-размразени сперматозоиди от бик

Table 1. Percentage of the motility, acrosomal and overall anomalies and hypoosmotical test (HOST) of frozen/thawed bulls spermatozoa

Група Group	Подвижност Motility	Акрозомни аномалии Acrosomal abnormalities	Общо аномалии Anomalies rall	Хипоосмотичен тест HOST
ГСА (BSA)	44,07 ± 2,98 ^a	4,00 ± 0,47 ^a	10,30 ± 0,69 ^a	47,00 ± 2,20
РГ (GSH)	50,56 ± 1,17 ^{ab}	4,41 ± 0,49 ^a	9,74 ± 0,83 ^a	45,52 ± 1,78
Контрола	49,81 ± 1,23 ^{ab}	6,52 ± 0,57 ^b	14,93 ± 1,07 ^b	43,70 ± 1,96
P	*	**	***	-

Различните стойности (a и b) в една колона показват достоверни разлики ($P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$); $P > 0,05$

държат морфологията на сперматозоидите и акрозомната цялост ($P < 0,01$) след размразяването, в сравнение с контролната група. Въпреки това, не са наблюдавани значими разлики в мембрания интегритет и подвижността на сперматозоидите след размразяване, след обогатяването на разредителя с антиоксиданти.

Концентрациите на LPO и антиоксидантната ензимна активност са показани в табл. 2. Концентрациите на малондиалдехид не се промениха значително с прибавянето на антиоксидантите след размразяване, в сравнение с контролната група. Активността на супероксид дисмутаза при всички експериментални групи с добавка на антиоксиданти остана значително ниска, в сравнение с контролната група ($P < 0,01$). Добавянето на BSA повиши активността на каталазата, сравнено с другите третирания, след замразяване/размразяването ($P < 0,001$). Нямаше достоверни разлики между групите с добавени ензимни антиоксиданти.

Криоконсервацията нанася непоправими щети на сперматозоидните органели, както и води до промени в мембранната флуидност и ензимната активност, свързана с намаляване на подвижността на сперматозоидите, жизнеспособността и оплодителните качества. При говеда BSA е намерен в течностите на

репродуктивните органи и помага за запазване на подвижността на сперматозоидите и акрозомната цялост по време на процеса на замразяване на спермата (Yamashiro et al., 2006).

В настоящото проучване редуцираният глутатион има слаб стимулиращ ефект върху подвижността на сперматозоидите, докато ROS се увеличават. По отношение на подвижността след размразяването, настоящите резултати са сходни с предишни проучвания при бик (Foote et al., 2002), където не се установява подобрене в подвижността на сперматозоидите в присъствието на РГ. Въпреки това, подвижността не се повлиява от образуването на липидна пероксидация. Това е в противоречие с проучвания при хора (de Lamirande and Gagnon, 1992), където е наблюдавано влошаване на подвижността на сперматозоидите в присъствие на свободни радикали. Тези противоречиви резултати могат да се дължат на разликите в състава на разредителя и концентрацията на глутатион. В това проучване BSA (5mg/ml) защитаваше морфологията на сперматозоидите и оплодителния потенциал при сперматозоиди от бик, със значителна антиоксидантна активност, в резултат на повишена активност на каталаза срещу увреждания при процеса на замразяване-размразяване. Аксозомата и

Таблица 2. Малондиалдехид – (MDA), редуциран глутатион – (GSH), супероксид дисмутаза – (SOD), глутатион пероксидаза – (GSH-Px) и каталаза – (CAT) нива в замразени-размразени сперматозоиди от бик

Table 2. Levels of malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) of frozen/thawed bull spermatozoa

Група Group	МДА MDA (nmol/l)	РГ GSH (nmol/l)	СОД SOD (μ kat/g protein)	ГП GSH-Px (nmol/NADPH/min/g protein)	КАТ CAT (μ kat/g protein)
ГСА (BSA)	1,88 \pm 0,45 ^a	1,39 \pm 0,24 ^b	0,05 \pm 0,005 ^a	3,90 \pm 1,17	304,23 \pm 114,69 ^b
РГ (GSH)	1,37 \pm 0,21 ^{ab}	0,57 \pm 0,19 ^b	0,03 \pm 0,005 ^a	5,99 \pm 0,52	165,53 \pm 28,84 ^a
Контрола	0,70 \pm 0,13 ^a	1,33 \pm 0,23 ^b	0,11 \pm 0,024 ^b	2,90 \pm 0,63	104,02 \pm 26,34 ^a
P	**	*	**	-	***

Различните стойности (a и b) в една колона показват достоверни разлики (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$); $P > 0,05$

свързаните фибри на тялото на сперматозоида са обхванати от митохондрии, които генерират енергия от вътреклетъчните запаси на АТР. Установено е, че ROS може да предизвика аксонемални и митохондриални увреждания, водещи до имобилизация на сперматозоидите (Peris et al., 2007). Въз основа на тези резултати се вижда, че GSH-PX и BSA имат защитен ефект върху сперматозоидната морфологична цялост на главата, средната и задните части, поддържат аксонемалната и митохондриална стабилност. В това проучване добавянето на антиоксиданти не предотврати липидната пероксидация или поддържането на нивата на глутатион пероксидазата и супероксид дисмутазата. Само каталазната активност бе по-висока в групата с BSA, в сравнение с другите групи.

Разреждането и замразяване-размразяването на сперма води до ниска антиоксидантна активност при наличие или липса на антиоксиданти. Това може отчасти да се обясни с по-ниската заплодяемост от замразена-размразена, в сравнение с прясна сперма (Bilodeau et al., 2001 г.). При други изследвания добавката на BSA води до значително по-добра заплодяемост, в сравнение с GSH и контролни групи. Това може би се дължи на по-високо ниво на каталаза, в сравнение с другите групи. Настоящите резултати са подобни на проучване, проведено при бици, по отношение на степента на бременност в групи с добавка на BSA.

Необходими са допълнителни проучвания за определяне на оксидативен стрес, антиоксидантен капацитет и оплодителните качества на сперма от бик, в резултат на процеса на замразяване-размразяване, за да се определят физиологично-биохимичните промени, които са важни за замразяване на сперма и *in vivo/in vitro* оплождане. Необходимо са допълнителни проучвания, за да се предотврати загубата на подвижност и фертилността на замразена сперма с ефективни антиоксиданти.

В заключение – добавянето на различни антиоксиданти към среди за замразяване подобри характеристиките на замразена-раз-

мразена сперма от бик. В сравнение с контролите, антиоксидантите (GSH и BSA) осигуриха криопротективен ефект върху морфологичната цялост на замразено-размразени сперматозоиди от бик. Освен това, BSA води до значително повишаване на каталазната активност.

ЛИТЕРАТУРА

Alvarez, J. G., Storey, B. T., 2005. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, 42: 334-346

Bearden, H. J., Fuquay, J. W., 2000. Semen evaluation. In: BEARDEN HJ, FUQUAY JW (Ed.), *Applied Animal Reproduction*. New Jersey: Prentice Hall, Upper Saddle River, pp. 168-182

Bilodeau, J. F., Blanchette, S., Gagnon, I. C., Sirard, M. A., 2001. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 56: 275-286

Dandekar, S. P., Nadkarni, G. D., Kulkarni, V. S., Punekar, S., 2002. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. *F. Postgrad. Med.*, 48: 186-189

De Lamirande, E., Gagnon, C., 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J. Androl.*, 13: 368-378

Foote, R. H., Brockett, C. C., Kaproth, M. T., 2002. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.* 71:13-23

Gadea, J., Selles, E., Marco, M. A., Coy, P., Matas, C., Romar, R., Ruiz, S., 2004. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing Extenders. *Theriogenology*, 62: 690-701

Peris, I. S., Bilodeau, J. F., Dufour, M., Bailey, J., 2007. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram semen, *Mol. Reprod. Dev.*, 74: 878-892

Schafer, S., Holzman, A., 2000. The use of transmigration and spermac stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 59: 201-211

Sikka, S. C., 2004. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J. Androl.*, 25: 5-18

Trincherro, G. D., Affranchino, M. A., Schang, L. M., Beconi, M. T., 1990. Antioxidant effect of bovine spermatozoa on lipid peroxidation. *Com. Biol.*, 8: 339-350

Viswanath, R., Shannon, P., 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 23-53

Yamashiro, H., Wang, H., Yamashita, Y., Kumamoto, K., Terada, T., 2006. Enhanced freezability of goat

spermatozoa collected into tubes containing extender supplemented with bovine serum albumin. *J. Reprod. Dev.*, 52:407-414

EFFECT OF VARIOUS ANTIOXIDANTS ON OXIDATIVE STRESS INDICATORS AND QUALITY OF FROZEN - THAWED SEMEN FROM BULLS

Iancho Todorov, Tania Todorova
Institute of Animal Science – Kostinbrod

ABSTRACT

Cryopreservation relates to production of reactive oxygenic substances (ROS), which lead to lipid peroxidation of the sperm membrane, leading to a loss of sperm motility, viability and fertility. The aim of the study was to determine the effect of two antioxidants – reduced glutathione (GSH) and bovine serum albumin (BSA) on the standard indicators of sperm quality (motility, acrosome and common abnormalities, HOST test) endogenous antioxidant enzyme activities and fertility of frozen - thawed semen from a bull.

Eighteen ejaculate from three indigenous bull obtained by artificial vagina were used. The ejaculate of nine samples are diluted with diluent Bioxcell® enriched with antioxidants including BSA (5 mg/ml), GSH (2 mM) and a diluent containing no antioxidants (control). The addition of antioxidants results in lower rates of acrosomal damages and common abnormalities. Superoxide dismutase (SOD) activity in all experimental groups was lower than the control group. Furthermore, BSA increased the activity of catalase after the process of freezing - thawing.

Key words: antioxidants, semen, bulls