

ГЕНЕТИКА, СЕЛЕКЦИЯ И РЕПРОДУКЦИЯ**ЕФЕКТ НА АНТИОКСИДАНТНИ ДОБАВКИ ПРИ СЪХРАНЕНИЕ НА СЕМЕННА ТЕЧНОСТ ОТ КОЧОВЕ****Янчо Тодоров, Таня Тодорова***Институт по животновъдни науки – Костинброд***РЕЗЮМЕ**

Проведено е проучване за изследване ефекта на антиоксидантните добавки цистеин и Витамин Е върху стандартните параметри на семенна течност от коч след съхранение в продължение на 0, 24, 48, 72 и 96 часа при 5°C, след получаване и разреждане. 30 еякулата от два коча бяха изследвани след разреждане Tris буфер с жълтък, съдържащ Витамин Е (1 mM), цистеин (10 mM) и контролна група без антиоксидант. След разреждане спермата се съхранява в хладилник (5°C) и в продължение на 4 дни бяха отчитани качествените параметри (мотилитет, жизнеспособност) на интервали от 24 часа. Експериментите са проведени извън репродуктивния сезон. Резултатите показват, че чрез добавянето на 1 mM Витамин Е или 10 mM L-цистеин към средата качеството на охладената сперма от коч се подобрява.

Ключови думи: Витамин Е, антиоксиданти, кочове, семенна течност, цистеин

Развитието на широкомащабни програми за изкуствено осеменяване (ИО) е свързано до голяма степен с транспорта и съхранение на семенна течност от генетично висококачествени мъжки животни. Целта на съхранението на сперматозоидите е да се удължи техният оплодителен капацитет. Съхраняването на семенна течност за кратко време е било постигнато чрез намаляване на метаболизма на сперматозоидите посредством понижаване температурата на съхранение. При съхранение на семенна течност при минусови температури метаболизмът спира. Въпреки че оплодителният капацитет на сперматозоидите може да се удължи чрез съхраняване в охладено или замразено състояние, процесът на съхранение неизбежно води до намаляване на подвижните сперматозоиди и дегенеративни промени в спермалните мембрани, което в крайна сметка намалява оплодителните качества и влошава резултатите от изкуственото осеменяване (Maxwell and Watson, 1996).

Оцеляването на сперматозоидите в семенната плазма е ограничено до няколко часа. За да се поддържа жизнеността на сперматозоидите за по-дълги периоди и да се охлади или замрази семенната течност, е необходимо добавяне на протективни вещества. Тези протективни добавки трябва да запазят оплодителния капацитет на сперматозоидите при съхранение при ниски температури. Независимо от добавянето на защитни среди, подвижността на сперматозоидите и целостта на мембраните се влошава по време на процеса на охлаждане и съхранение при ниски температури. Вероятно дегенеративните промени са в резултат на липидна пероксидация или прекомерно производство на реактивни кислородни субстанции (Vecconi at al., 1993).

Изследвани са много методи за защита срещу реактивни кислородни субстанции (РОС), като например съхраняване в среда с ниско кислородно съдържание или добавяне на антиоксиданти в сперморазредителите. Има много изследвания с различни антиок-

сиданти и резултатите често са противоречиви. Добавянето на супероксид дисмутаза и каталаза в Tris разредители, използвани за съхраняване на семенна течност от коч, води до повишена подвижност, съхраняване на целостта на акрозомата и по-добри оплодителни качества (Maxwell at al., 1996).

Експерименти, проведени от Upreti at al. (1997), не доказват защитния ефект на *Витамин Е* върху сперматозоиди от коч, докато Cerolini at al. (2000) твърдят, че *Витамин Е* увеличава подвижността на охладени сперматозоиди от нерез. Breiningger (2005) доказва, че *витамин Е* предотвратява оксидативния стрес при семенна течност от нерез, съхранявана при 19°C.

Целта на нашите изследвания бе удължаване на периода на съхранение при 5°C и поддържане на качествените параметри при семенна течност от кочове, получена извън репродуктивния сезон чрез добавяне на антиоксиданти (*Витамин Е* и *цистеин*) в разредителите.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проведохме изследване за установяване влиянието на антиоксидантни добавки *Цистеин* и *Витамин Е* върху стандартните параметри на семенна течност от коч след съхраняване в продължение на 0, 24, 48, 72 и 96 часа, при 5°C, след получаване и разреждане.

Бяха изследвани 30 еякулата от два коча, разредени с жълтъчен трис буфер, съдържащ *Витамин Е* (1 mM), *цистеин* (10 mM), и контролна група без антиоксидант. След разреждане семенният материал се държи в хладилник (5°C) и в продължение на 4 дни се изследваха през интервал от 24 часа качествените параметри (мотилитет и преживяемост). Експериментите бяха проведени извън репродуктивния сезон.

Материалът бе получаван два пъти седмично с помощта на изкуствена вагина. Семенният материал от двата коча бе анализиран поотделно за отчитане на вариабилност-

та. От всеки коч бяха получени по два еякулата през 10–15 минути. Еякулатите бяха смесени и разпределени по групи.

Обработка на семенната течност

След получаване еякулатите бяха разделени на три части и разредени, в зависимост от експерименталния протокол. Първото разреждане 1:1 се прави при 37°C непосредствено след получаване на материала. Преди анализа пробите се съхраняваха на водна баня при 37°C. Семенната течност бе анализирана около 10 минути след получаването. Извършваше се рутинна оценка за обема на еякулата, подвижността и концентрацията на сперматозоиди. В експериментите бяха включени само еякулати, отговарящи на следните условия: обем над 0,5 ml; минимална концентрация на сперматозоиди 3×10^9 spz/ml; подвижност над 70%.

Второто разреждане се провежда при стайна температура (20°C) до достигане на концентрация на сперматозоиди от $1-1,6 \times 10^9$ spz/ml. Основният разредител бе трис буфер, съдържащ: 375 mM Tris (hydroxymethyl-aminomethane); 124 mM citric acid anhydrous; 41.6 mM glucose, 20% жълтък (v/v), pH = 6,8 – 6,9).

Експерименталните разтвори са: Трис буфер, обогатен с 1mM *витамин Е* (DL- α -tocopherol); Трис буфер, обогатен с 10 mM *L*-*цистеин*

Преценка на охладената семенна течност

След разреждане семенната течност се съхранява в хладилник (5°C) в продължение на 4 дни и през 24-часов интервал се преценяват качествените параметри (подвижност и жизненост). Подвижността се преценяваше с използване на фазово-контрастен микроскоп върху отопляема масичка при 37°C.

Жизнеността бе преценена след суправитално оцветяване с eosin-nigrosin (5% w/v nigrosin; 0,6% w/v eosin; 3% w/v sodium citrate dehydrate). Оцветителят прониква само през увредени мембрани и се приема, че розово оцветените сперматозоиди са мъртви, а неоцветените са живи. Преброяват се най-

малко двеста сперматозоиди. Експериментите бяха повторени 5 пъти за всеки вариант и всяко животно. Разлики при $p < 0,05$ бяха считани за статистически достоверни.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Според получените резултати в рамките на 4 последователни дни, преживяемостта на контролната група намалю с около 53%, докато при опитните групи намалението бе 50% – при групата с добавен *Витамин Е*, и 49% – при групата с добавен *цистеин*. През първите 72 часа разликата между контролната и опитните групи не бе достоверна. След 96 часа, при $p < 0,05$, преживяемостта на контролата бе $39,09 \pm 2,65^a$, сравнено с $43,21 \pm 2,56^a$ и $43,72 \pm 3,55^a$ за разредителите, съдър-

жащи антиоксидантите *Витамин Е* и *цистеин*, съответно.

Резултатите показват, че и двата антиоксиданта, *Витамин Е* и *цистеин*, имат про-тективен ефект върху мембраните (преживяемост) и подвижността на семенната течност при всички животни. Тези резултати имат практическа стойност, тъй като материалът бе получен извън сезона за разплод и не бе с оптимално качество.

Резултатите, отчитащи ефекта на *Витамин Е* и *цистеин* върху качеството на семенната течност от първия коч, са посочени в табл. 1 (жизненост) и табл. 2 (подвижност). Според резултатите, получени в рамките на 4 последователни дни, жизнеността на семенната течност от контролната група намалю с около 53% – от $92,53\% \pm 2,90\%$ до $39,09\% \pm 2,65\%$, докато при експерименталните групи

Таблица 1. Ефект върху жизнеността на сперматозоидите (%) при първия коч

Table 1. Effects on the spermatozoan viability (%) of the first ram

Час Hours	Контрола Control	Вит. Е (1 mM) Vit. E (1 mM)	Цистеин (10 mM) Cystein (10 mM)
0	92,53±2,90	93,13±2,13	92,74±2,15
24	82,92±4,56	84,39±2,74	83,41±0,95
48	60,79±3,41	62,67±5,02	62,43±1,94
72	50,51±5,56	52,70±3,57	52,65±2,02
96	39,09±2,65 ^a	43,21±2,56 ^a	43,72±3,55 ^a

Резултатите са посочени като стандартно отклонение. Суперскрипта показва достоверните разлики в същия ред ($p < 0,05$).

Таблица 2. Ефект върху подвижността на сперматозоидите (%) при първия коч

Table 2. Effects on the spermatozoan motility (%) of the first ram

Час Hours	Контрола Control	Вит. Е (1 mM) Vit. E (1 mM)	Цистеин (10 mM) Cystein (10 mM)
0	91,35±4,37	93,52±1,44	92,30±3,36
24	81,10±5,67	83,06±2,58	81,50±4,11
48	61,10±3,94	70,50±3,68	69,00±5,16
72	45,05±4,97	57,50±5,40	53,50±6,68
96	33,20±4,83 ^a	44,55±2,73 ^a	43,00±2,65 ^a

Резултатите са посочени като стандартно отклонение. Суперскрипта показва достоверните разлики в същия ред ($p < 0,05$).

жизнеността бе по-ниска с 50% при *Витамин Е* и 49% при групата с добавен *цистеин*.

През първите 72 часа промените в жизнеността при контролната и опитните групи не са достоверни. След 96 часа, при $p < 0,05$, жизнеността на контролната група е значително понижена – от $39,09 \pm 2,65\%$, сравнено с $43,21 \pm 2,56\%$ и $43,72 \pm 3,55\%$ при разреждителите, съдържащи *Витамин Е* и *цистеин*, съответно. При експерименталните групи няма достоверни разлики.

При наблюдение в продължение на четири дни, подвижността намаля с 58% при контролите и с 49–50% при експерименталните групи (табл. 2). През първите 72 часа съхранение при 5°C, както и при жизнеността, разликите в подвижността не са достоверни ($p < 0,05$) при контролите и експерименталните групи. Обаче след 96 часа култивиране средната

подвижност при контролите ($33,20 \pm 4,83\%$) е значително по-ниска ($p < 0,05$), сравнено със стойностите от експерименталните групи, $44,55 \pm 2,73\%$ и $43,0 \pm 2,65\%$, съответно.

При втория коч жизнеността варира, както при първия коч (табл. 3). През 72-часовия период резултатите от контролата и опитните групи са почти едни и същи. След 96 часа резултатите са значително по-добри при всички групи, в сравнение с контролната.

При втория коч подвижността намалява значително, в сравнение с първия коч, с 63% при контролата и с 58–59% за експерименталните варианти (табл. 4). При подвижността се забелязват същите тенденции, като при първия коч няма промени при 72 часа култивиране, но при 96 подвижността бе значително по-голяма в присъствието на антиоксиданти, в сравнение с контролата.

Таблица 3. Ефект върху жизнеността на сперматозоидите (%) при втория коч

Table 3. Effects on the spermatozoan viability (%) of the second ram

Час Hours	Контрола Control	Вит. Е (1 mM) Vit. E (1 mM)	Цистеин (10 mM) Cysteine (10 mM)
0	90,09±2,3	91,10±1,31	90,99±1,80
24	76,03±1,71	77,80±1,38	76,43±0,88
48	61,81±1,96	64,75±1,06	63,35±0,77
72	42,04±2,22	45,17±0,78	44,68±0,52
96	30,04±0,79 ^a	34,45±0,96 ^a	33,88±0,56 ^a

Резултатите са посочени като стандартно отклонение. Суперскрипта показва достоверните разлики в същия ред ($p < 0,05$).

Таблица 4. Ефект върху подвижността на сперматозоидите (%) при втория коч

Table 4. Effects on the spermatozoan motility (%) of the second ram

Час Hours	Контрола Control	Вит. Е (1 mM) Vit. E (1 mM)	Цистеин (10 mM) Cysteine (10 mM)
0	88,30±3,49	89,3±3,49	88,5±3,28
24	73,52±4,74	74,0±4,59	72,5±2,63
48	59,03±3,94	62,0±4,21	60,5±2,83
72	39,50±2,83	43,0±3,49	41,0±3,94
96	25,00±4,08 ^a	31,5±2,41 ^a	30,0±4,08 ^a

Резултатите са посочени като стандартно отклонение. Суперскрипта показва достоверните разлики в същия ред ($p < 0,05$).

Разработването на методи за изкуствена целогодишна стимулация на еструс при овце стимулира изследванията върху възможността за дългосрочно съхраняване и криоконсервация на семенна течност от коч. Има много изследвания, които доказват, че заплодяемостта след интрацервикално осеменяване на овце драматично се понижава, успоредно с времето на съхраняване. Намаляването на заплодяемостта е в рамките на 10–35% за ден съхранение в охладено състояние. Например при осеменяване със свежа семенна течност 75–85% от овцете се заплождат, докато заплодяемостта при 24, 48 и 72 часа съхранение е съответно 45–50%, 25–30% и 15–20% съответно (Salamon and Maxwell, 2000).

Оксидативният стрес е един от най-важните фактори, свързани с намаляване на фертилитета при съхранение на семенна течност. Плазмената мембрана на сперматозоидите съдържа голям брой ненаситени мастни киселини, които са податливи на липидната пероксидация, а последствията са многобройни, като се започне от увреждане на мембраната, разстройство на клетъчните функции и ниска подвижност (Ball et al., 2001). Добавянето на антиоксиданти предотвратява или намалява процеса на пероксидация. В това изследване се анализират ефектите на *Витамин Е* и *цистеин* върху подвижността и целостта на мембраната на сперматозоиди от коч след разреждане и съхраняване в хладилник при температура 5°C.

Витамин Е включва група от липидно разтворими съединения, токофероли и токотриеноли, които действат като антиоксиданти и защитават организма от оксидативен стрес. Смята се, че *Витамин Е* е основен компонент на антиоксидантната система на сперматозоидите, и е един от най-големите протектори на мембраните срещу РОС и ЛПО. Той не се синтезира в клетките на бозайниците. След като мембранният токоферол се изконсумира по време на периода на оксидативен стрес, клетъчните липиди са предмет на пероксидация, която може да доведе до токсични увреждания. *Витамин Е* може да инхибира липидната пероксидация при реакцията в

мембраната чрез премахване на пероксидни, алкоксилни и други радикали с липиден произход. Доказано е, че добавки, съдържащи *Витамин Е*, спомагат за увеличаване на обема на семенната течност и концентрацията на сперматозоидите при нерези, говеда, зайци и кочове. Въпреки това, има ограничени данни относно ефектите на *цистеина* и на *Витамин Е* в различни разреждатели върху качеството на семенната течност (Uysal and Bucak, 2007). Според проучване на Тодорова, Т. (2014) прибавяне на 0,1 mM *Витамин Е* към цитратен сперморазредител (ЦР) води до значително подобряване подвижността и жизнеспособността на сперматозоидите при коч.

Изследвания върху семенна течност от коч, съхранявана при 15°C, показват, че добавянето на *Витамин Е* в криопротектора намалява подвижността на сперматозоидите (Uysal and Bucak, 2007). Нашите изследвания показват, че добавянето на 1 mM *Витамин Е* оказва протективен ефект върху интегритета на клетъчните мембрани и подвижността. Стойността на тези параметри е по-висока при опитните групи след 96 и 120 h съхраняване при 5°C, в сравнение с контролата. Тези резултати потвърждават твърденията на Vesoni et al. (1993), които откриват протективен ефект срещу липидната пероксидация на плазмените мембрани след добавяне на 1mg/ml *витамин Е* към сперматозоиди от бик и коч. При добавяне на 10 mM *цистеин* в криопротектора подвижността и преживяемостта на сперматозоидите при съхранение за 96 часа се подобри значително ($p < 0,05$), спрямо контролната група. Позитивният ефект на цистеина се дължи на серия от фактори. Цистеинът е тиолово съединение, което може да пенетрира плазмената мембрана и е прекурсор на интрацелуларния синтез на глутатион. Известно е, че цистеинът протектира сперматозоидите от токсичните оксидни метаболити, които предизвикват липидна пероксидация на спермалните плазмени мембрани при *in vitro* условия (Meister, 1994). Добавянето на цистеин към цитратен сперморазредител (ЦР) увеличава подвижността на сперматозоидите след размразяване на семенна течност от бик

(Тодорова, Т., 2014). Funahashi and Sano (2005) докладват, че спермален разрежител с добавен 5 mM цистеин подобрява преживяемостта и мембранния интегритет на замразени сперматозоиди от нерез.

От получените резултати стигахме до извода, че податливостта на плазмените мембрани на сперматозоидите към пероксидация на липидите е различна както при различните видове, така и между индивидите от един вид.

Нашите резултати показват, че чрез добавяне на 1 mM витамин Е или 10 mM L-цистеин към Трис медиум, качеството на охладената семенна течност от коч се подобрява. Тези данни са важни за практиката, още повече, че експериментите бяха проведени със семенна течност, получена извън размножителния период, когато качеството на семенната течност е по-лошо.

ЛИТЕРАТУРА

Тодорова, Т., 2014. Ефект на Витамин Е и цистеин върху криоконсервирана семенна течност от бик. *Животновъдни науки*, LI, 3, 3-8

Ball, B., Medina, V., Gravance, C., Baumber, J., 2001. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology*, 56:577-589

Beconi, M. T., Francia, C. R., Mora, N. G., 1993. Affranchine MA, Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*, 40: 841-851

Breining, E., Beorlegui, F., Beconi, M., 2005. Alphatocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreservation boar semen. *Theriogenology*, 63: 2126-2135

Cerolini, S., Maldjian, S., Noble, R., 2000. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim Reprod Sci*, 58: 99-111

Funahashi, H., Sano, T., 2005. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C. *Theriogenology*, 63(6): 1605-16

Maxwell, W. M. C., Watson, P., 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci*, 42: 55-65

Maxwell, W. M. C., Stojanov, T., 1996. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod. Fertil. Dev.*, 8: 1013-1020

Meister, A., 1994. Glutathione, ascorbate and cellular protection. *Cancer Research*, 54:1969-1975

Uysal, O., Bucak, M. N., 2007. Effect of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen thawed ram semen. *Acta Vet. Brno*, 76: 383-390

Upreti, G., Jensen, K., Oliver, J., Duganzich, D., Munday, R., Smith, J., 1997. Motility of ram spermatozoa during storage in chemically-defined diluent containing antioxidants. *Anim. Reprod Sci*, 48: 269-278

Salamon, S., Maxwell, W. M. C., 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 77-111

EFFECT OF ANTIOXIDANT SUPPLEMENTS IN A STORED SEMEN FROM RAMS

Iancho Todorov, Tania Todorova
Institute of Animal Science – Kostinbrod

ABSTRACT

We conducted a study investigating the effect of antioxidant supplements Cysteine and Vitamin E on the standard parameters of a ram seminal fluid after storage for 0, 24, 48, 72 and 96 hours at 5°C after collection and dilution. 30 ejaculates from two rams were examined, diluted with yolk Tris buffer containing vitamin E (1 mM), cysteine (10 mM) and a control group without antioxidant. After dilution the semen was kept in a refrigerator (5°C) and for 4 days the qualitative parameters (motility, viability) were examined at intervals of 24 hours. Experiments were conducted outside the reproductive season. Results show that by the addition of 1 mM vitamin E or 10 mM L-cysteine to the Tris medium, the quality of the chilled semen ram improves.

Key words: rams, semen, antioxidants