

О Б З О Р**ОСНОВНИ ФИЗИКОХИМИЧНИ ФАКТОРИ,
ВЛИЯЕЩИ ВЪРХУ МОРФО-ФУНКЦИОНАЛНИЯ
ИНТЕГРИТЕТ И МЕТАБОЛИТНАТА АКТИВНОСТ
НА СПЕРМАТОЗОИДИ ОТ ПТИЦИ**

ВАСИЛ АТАНАСОВ

Тракийски университет, Аграрен факултет - Стара Загора

Във връзка с разгадаването на интимните механизми на мотилитета и фертилитета на птичите сперматозоиди много автори провеждат редица важни експерименти за проучване влиянието на цял спектър от фактори, влияещи на метаболитните процеси, протичащи в гаметите. Тези фундаментални изследвания спомогнаха за синтезирането на няколко протективни среди, осигуряващи физиолого-биохимичен комфорт на третираните сперматозоиди. По този начин бяха създадени сериозни предпоставки за масовото навлизане на такива нови биотехнологични методи в птицевъдството, като изкуственото осеменяване и криоконсервацията.

През последните десетилетия проучванията на световната научна общност бяха насочени главно относно влиянието на редица физикохимични фактори върху качествените показатели на сперма от птици във връзка със създаването на сперморазредители за изкуствено осеменяване (**Surai, P.F. and G.J. Wishart, 1996**). Подобно на дискутираните в други наши публикации (**Атанасов, В., 2005; Георгиев и др. 1998; Димитров и др., 1995; Atanasov et al., 1998, 1999a, 1999b, 2007; Dimitrov, et al., 2000**) и тук най-важни са следните параметри: процент подвижни сперматозоиди, виталитет, мотилитет, фертилитет и свързания с тях енергиен метаболизъм. Най-многобройни са фундаменталните проучвания, извършвани в Лабораторията по животновъдство към Аграрния факултет на университета Миязаки, Япония. Освен Япония водещи страни в това отношение са Франция, САЩ, ФРГ, Великобритания и напоследък България и Унгария.

**ФАКТОРИ, ВЛИЯЕЩИ НА ЕНЕРГИЙНИЯ МЕТАБОЛИЗЪМ
НА ПТИЧИТЕ СПЕРМАТОЗОИДИ**

През седемдесетте години **McIndoe W.M. and Lake P.E. (1973)** полагат основите на съвременната биоенергетика при птичите сперматозоиди с труда си "Aspects of energy metabolism of avian spermatozoa."

Процесите на поддържане нивото на АТФ и зависимите от това мотилитет и оплодителна способност на сперматозоиди от петел и пуяк са проучвани още от **Wishart G.J. (1982)**. По-късно същият автор (**Wishart, 1984**) проследява метаболизма на сперматозоиди от същите видове при ниска температура. Доказано е, че при температура 5° С нивото на кислородната консумация (която авторът смята за маркер на енергийния метаболизъм) намалява със 75-80% в сравнение с това при 40° С. Нивото на АТФ обаче се запазва същото, вероятно поради забавянето на спермалния мотилитет. Интензивността на гликолизата при сперматозоиди от

петли намалява над 20 пъти в сравнение с тази при 40° С, но отново при запазени АТФ нива. При пуешките гамети гликолизата също протича много по-бавно при 5° С, но за разлика от сперматозоидите от петли, те не са способни да запазят първоначалните АТФ концентрации. Установено е, че пуешките, но не и петльовите сперматозоиди използват предимно аеробния метаболизъм за компенсиране на енергийните си разходи при всички изследвани температурни нива между 5° и 40° С.

Изследван е и ефектът на рН върху метаболизма и оплодителната способност на сперматозоиди от пуяк (**Pinto et al.**, 1984). Установено е, че кислородният ъптейк по време на 4 - часов инкубационен период при 37°С, както и мотилитетът на гаметите се повишава значително с повишаване рН нивата на средата от 6.3 до 8.8. Превръщането на глюкозата във фруктоза протича независимо от значението на рН. Натрупването на млечната киселина и окисляването на глюкозата протича по-интензивно при рН 7.8 в сравнение с това при рН 6.8. Процентът на оплодените яйца, получени чрез осеменяването със свежа сперма, разрежена със среда с рН 7.8 обаче е доказано по-нисък в сравнение с този от среди с рН 6.8 или 7.3.

В по-ново време птичите сперматозоиди се използват и като модел за проучване регулаторните аспекти на енергийния метаболизъм (**Kamp et al.**, 1996). Авторите разглеждат гаметите като високо специализирани клетки, които са много подходящи за изучаване на основните аспекти на енергийния контрол - АТФ хомеостазиса на клетъчната функция, механизмите на умора и метаболитна депресия, метаболитните взаимовръзки и организацията и регулацията на гликолитичните ензими. При аеробни условия фосфорилиращата система функционира с максимална мощност и посредством совалчест механизъм доставя енергийно богати фосфати от митохондриите към динеиновата АТФ-аза. В това сравнително изследване, според авторите, съхраняването на пуешки и шаранови сперматозоиди за няколко часа без екзогенни субстрати и кислород причинява разграждане на креатинфосфата и АТФ до неорганичен фосфат и АМФ. (Факт, установен от нас по отношение на сперма от петли няколко години по-рано - **Atanasov et al.**, 1993) Въпреки ниския енергиен добив, съхранените сперматозоиди и от двата вида са били способни за извършването на прогресивно-настъпателни движения. При изтощаването на шарановите гамети този процес не е съпроводен с драматична ацидоза, която се смята за основна причина за настъпването на мускулната умора. (Тези резултати са в абсолютно съответствие с наши изследвания, доказващи практически постоянно лактатно ниво до 24-ия час при съхраняването на шаранови еякулати - **Атанасов**, 1995). Отново според **Kamp et al.** (1996) енергийният метаболизъм при сперматозоиди от нерез е основно базиран на гликолитично консумиране на екстрацелуларни въглехидрати и продукцията на лактат и протони. Тези гамети изглежда издържат ниско интрацелуларно рН (<6.5). Липсата на фосфорилираща система (не е открита енергийна совалка, пренасяща макроерги от митохондриите към динеиновата АТФ-аза) вероятно се компенсира от висока гликолитична АТФ продукция в междумитохондрийното пространство на флагелите. По отношение на биоенергетиката на сперматозоидите от други животни (нерез) тези резултати взаимно се допълват и от наши успоредни проучвания относно биологични и биохимични промени на съхранявана сперма от нерези (**Атанасов и др.**, 1996). Подобни резултати по отношение на биоенергийния метаболизъм се получават и при извършеното от нас сравнително изпитване на някои световно признати сперморазредители за паточи (**Atanasov et al.**, 2007). Почти веднага **Blesbois E. and Brillard J.** (2007) цитират и посочват достойнствата на тези изследвания.

Криоконсервацията също оказва влияние върху някои основни параметри на енергийния метаболизъм, а оттам и върху подвижността на петльови сперматозоиди (**Ochkur et al.**, 1994). Доказано е, че след размразяване на сперматозоидите се инхибира окисляването на глюкозата,

но се активира това на сукцината двукратно. Добавянето на екзогенни субстрати (сукцинат, малат, аскорбат), както и разединители на окислителното фосфорилиране стимулира кислородната консумация. Напротив, ротенонът, антимицин А, 2,4-динитрофенолът и калиевият цианид блокират напълно дишането на сперматозоидите.

ФАКТОРИ, ВЛИЯЕЩИ НА МОТИЛИТЕТА НА СПЕРМАТОЗОИДИ ОТ ПТИЦИ

Факторите, оказващи въздействие върху спермалната подвижност са изключително много. В лабораторията по животновъдство към Аграрния факултет на университета Миязаки, Япония са извършени поредица от изследвания за установяване влиянието на екзогенни и ендогенни модулатори. Проучен е ефектът на тетрафенилборона върху мотилитета и метаболизма на птичи сперматозоиди при 30°C (**Ashizawa et al.**, 1990). Доказана е негативната роля на това съединение по отношение на подвижността и кислородната консумация на интактни, но нативни сперматозоиди. По отношение на демембранизирани гамети тетрафенилборонът няма ефект, което показва, че локусът на въздействие не е разположен директно върху аксонемата на сперматозоидите от петел.

Регулацията на флагеларната подвижност на птичи сперматозоиди се влияе и от специфични йонни модулатори. Изследвана е възможната роля на интрацелуларните Ca^{2+} и калций-свързващия белтък калмодулин относно мотилитета на мъжките гамети (**Ashizawa et al.**, 1994a). Свързването на калциевите катиони с 1,2-би (2-аминофенокси) етан-N,N,N,'N' - тетраацетат/тетраацетоксиметил естер и третирането с калмодулинови антагонисти като N-(6-аминохексил)-5-хлоро-1-нафталенсулфонамид хидрохлорид, N-(6-аминохексил) -1-нафталенсулфонамид хидрохлорид и трифлуоперазин влияе негативно на спермалния мотилитет при t-30° C. Напротив, допълнителното прибавяне само на 2 mmol Ca^{2+} към средата възстановява движението на гаметите. Интересно е, че концентрацията на интрацелуларните Ca^{2+} бързо нараства на 0 до 100 nmol.l⁻¹, което доказва съществуването на мембранен калций транслоциращ механизъм, нагнетяващ Ca^{2+} срещу 50 пъти по-висок концентрационен градиент. Повторното добавяне на Ca^{2+} хелатори отново предизвиква инхибиране на мотилитета, съпътстващо с понижаване на кислородната консумация и нивото на АТФ. Това доказва енергийното изтощаване на сперматозоидите, което вероятно е допълнителна причина за имобилизирането им. Описаните ефекти обаче, не се наблюдават при демембранизирани сперматозоиди, което е доказателство за съществуването на мембрансвързани механизми регулиращи интрацелуларната Ca^{2+} концентрация. В подкрепа на тези факти са и проучванията на **Ashizawa et al.** (1992), които демонстрират влиянието на тази концентрация върху мотилитета и дишането на сперматозоиди от петел.

По - късни проучвания доказват съществуването на специфична протеинкиназа С, с молекулна маса около 80 kDa, отговорна за описаното по-горе високоградиентно Ca^{2+} транслоциране и осигуряване на спермалния мотилитет (**Ashizawa et al.**, 1994b). Намерено е, че тази ендогенна протеинкиназа е ситуирана в цитоплазмения матрикс или в спермалната мембрана, но в никакъв случай в аксонемата. Доказано е, че активирането на този ензим влияе върху флагеларната подвижност на сперматозоидите от петел.

Интрацелуларната протонна концентрация също оказва мощно въздействие върху подвижността на сперматозоидите. Паралелни изследвания доказват влиянието ѝ върху температурнозависимото имобилизиране на птичи сперматозоиди (**Ashizawa et al.**, 1994c). Експериментирано е с рН_e от 7.3 до 10.1, с подходящи среди при температура от 30 до 40°C. Тези проучвания демонстрират, че обратимото температурнозависимо имобилизиране на спер-

матозоидите от петел при 40°C се преодолява чрез повишаване на вътреклетъчните стойности на рН. Освен това е възможно ефектите от повишаване на рН_i да не са директно върху динеиновата АТФ-аза, а чрез посредничеството на Ca²⁺ модулатори в аксонемата.

Някои ензимни инхибитори също ефектират спермалния мотилитет. Подвижността и дишането на интактни птичи сперматозоиди могат да се ефектират чрез каликулин А - специфичен инхибитор на протеинфосфатаза-1 и 2, чрез Ca²⁺ зависими механизми (**Ashizawa et al.**, 1995). Доказана е регулиращата роля на каликулина, който чрез инхибиране на протеинфосфатазите възстановява мотилитета на гаметите. Освен това каликулинът стимулира нивото на кислородна консумация на сперматозоидите и предизвиква съпътстващо понижаване концентрацията на АТФ. Последното сугестира за зависимостта на хидролизата на АТФ и степента на окислителното фосфорилиране в гаметите. Тъй като подвижността и кислородният ъптейк на сперматозоидите се потискат от интрацелуларните Ca²⁺ хелатори, не е постигнато стимулиране чрез самостоятелното прилагане на каликулин А, а само чрез съпътстващото добавяне на 2 mmol Ca²⁺ към средата. Тези резултати доказват, че инхибирането на ендогенните протеинфосфатази 1 и 2 може да стимулира мотилитета и метаболитната активност на сперматозоиди от петел при температура 40°C, посредством механизми, регулиращи нивото на вътреклетъчните свободни калциеви катиони.

В подобен аспект е експериментирано и с редица алостерични модулатори. Проучвана е възможната роля на тирозинкиназата в регулацията на подвижността на сперматозоиди от петел, чрез използване на стабилен аналог на Ербастатина - метил 2,5-дихидрооксицианамат (**Ashizawa et al.**, (1998). Последният е специфичен инхибитор на тирозинкиназата и потиска подвижността на интактни сперматозоиди при температура 30°C. Напротив, същият инхибитор не влияе върху демембранизирани гамети. При температура 40°C и интактните и демембранизираните сперматозоиди са неподвижни. Интактните гамети, стимулирани чрез прибавката на Ca²⁺ или каликулин А губят своята подвижност след добавянето на метил 2,5-дихидрооксицианамат при 40°C. Все пак, за разлика от мотилитета, концентрацията на АТФ в сперматозоидите се е задържала около 30-35 pmol /109 cells през инкубационния период. Активността на тирозинкиназата в гаметите при температура 30° С установена чрез измерване фосфорилирането на синтетичен пептиден субстрат е била 0,17 pmol/min/mg протеин. Тази активност е била по-ниска от тази в тестиси на петел или пилешки мозък, но по-висока в сравнение с активността в пилешки черен дроб. Тези резултати доказват, че тирозинкиназната активност, която не се наблюдава в аксонемата и/или достъпните цитоскелетни компоненти, може би е причина за съхраняването на флагеларната подвижност на сперматозоидите от петел при температура 30° С.

Сходни са и *in vitro* проучванията на **Barna et al.** (1998) относно влиянието на таурин върху мотилитета на сперматозоиди от петел и нивото на интрацелуларните свободни Ca²⁺. Не са открити промени в концентрацията на калциевите катиони при третираните с таурин гамети, както и промени в мотилитета и метаболизма им.

По-скорошни изследвания са доказали възможната роля на протеин-карбоксилметилазата върху регулацията на флагеларните движения при птичи сперматозоиди (**Ashizawa et al.**, 2000a), Изглежда, че този ензим може да предпазва цитоплазматичния матрикс и /или плазмената мембрана, но не е свързан с аксонемата и /или достъпните цитоскелетни компоненти на сперматозоидите от петел.

Във връзка с оптимизиране на храненето на петлите е проучван *in vitro* ефектът на β-каротина върху мотилитета, нивото на АТФ и интрацелуларните свободни Ca²⁺ на птичите сперматозоиди (**Ashizawa et al.**, 2000). Получените резултати доказват, че β-каротинът модулира

флагеларната подвижност на гаметите без да променя енергийната продукция, както и че влиянието му засяга цитоплазматичния матрикс и /или плазмената мембрана, но не и аксонемата и /или достъпните цитоскелетни компоненти на сперматозоидите от петел.

ФАКТОРИ, ВЛИЯЕЩИ НА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛНИЯ ИНТЕГРИТЕТ НА СПЕРМАТОЗОИДИ ОТ ПТИЦИ

Едно ново високopersпективно направление, по което работят водещите лаборатории в областта на репродуктивната биохимия, е използването на антиоксиданти, протектиращи спермалните мембрани от негативното въздействие на свободните радикали, които нормално се получават при окислително-редукционните процеси протичащи във всяка жива клетка (**Long and Kramer**, 2003; **Surai**, 1983, 1984; **Surai et al.**, 1998b).

Установено е, че изхранването на разплодните пуйци с повишени дози витамин Е води до достоверно повишаване качествените показатели на семенната течност (**Cerolini et al.**, 2000, 2003; **Surai et al.**, 1998a). В случая бихме приели твърдението на авторите, че мъжките птици, изхранвани с повишени дози витамин Е, продуцират сперматозоиди "обогатени" с витамин Е, което стабилизира спермалните мембрани и протектира гаметите от липидна пероксидация. Известно е, че витамин Е "прочиства" плазматичните мембрани от алкил пероксидилните радикали, които причиняват прекисното окисление на ненаситените мастни киселини (второ ниво на защита на клетката - **Surai**, 2002, 2003). Според много автори (**Атанасов**, 2005; **Maldjian et al.**, 1998; **Surai et al.**, 1997, 1997a, 1998a, 1998c, 2000, 2000a) предотвратяването на деструктивните процеси в течено-мозаечната структура на спермалните мембрани, чрез неутрализиране действието на свободните радикали, причиняващи прекисното окисление на полиненаситените мастни киселини е причина за протективното действие на α -токоферола спрямо мембранните компартменти на сперматозоидите.

Наши независими проучвания също установяват ефекта на нивото на витамин Е в дажбата на пуйци върху биологичната пълноценност на семенната течност (**Димитров и др.**, 2003). Тези изследвания доказаха, че добавката на 40 mg и 60 mg Rovimix E-50 AS на kg фураж води до повишаване концентрацията на витамин Е в спермалната плазма на пуйци от 4.10-4.55 до 4.56-4.66 $\mu\text{g/ml}$. Стойностите на установените биологични и биохимични показатели на разредената и съхранена (+10-15 C/6 h) сперма показват, че добавката на витамин Е във фуража протектира сперматозоидите от липидната пероксидация. Установихме също, че протектиращото влияние на липидния антиоксидант витамин Е върху спермалните мембрани, е по - отчетливо при бихимичните показатели на разредената със сперморазредителя TUR-2 и съхранена (+10-15 C/6 h) сперма от пуйци след изхранване с Rovimix E-50 AS.

Подобни резултати по - късно получават и други автори (**Lin et al.**, 2005), с което мнението, че α -токоферолът би могъл да се използва като мощен суплемент за повишаване фертилитета на гаметите, а оттам и ефективността на изкуственото осеменяване в птицевъдството, окончателно се потвърди.

Съдържанието на полиненаситени мастни киселини и активността на глутатионпероксидазата също оказват влияние върху общия антиоксидантен капацитет на птичата сперма (**Surai et al.**, 1998). Освен това има определена връзка между активността на супероксиддисмугазата и липидната пероксидация (**Breque et al.**, 2003)

В подобен аспект заместването на натриевия селенит, като източник на неорганичен селен в дажбата на разплодниците, с органичен селен под формата на селенометионин, е един от революционните методи за повишаване оплодителната способност на гаметите в съв-

ременното животновъдство. Схващането на **Edens et al.** (2002) за значението на фосфолипид-хидропероксид-глутатионпероксидазата (PH-GSHpx) съдържаща селен, за запазване на целуларния интегритет се потвърждава и от нашите независими изследвания. Ние установихме, че прибавянето на Sel-Plex (0.3 ppm) към дажбата на разплодни пуйци осигурява ефективна протекция на морфо-функционалния интегритет на спермалните мембрани при *in vitro* съхраняването на разредена с TUR-2 семенна течност при $t + 15^{\circ} \text{C}$ за 6 h (**Dimitrov, et al.**, 2007). Освен това оплодителната способност на сперматозоидите на пуйци получавали добавката Sel-Plex™ е по-висока с 3%. Нашите проучвания се цитират от редица автори (**Fishinin et al.**, 2008; **Jang Mei Jun**, 2009) и допълват данните на **Surai et al.** (1992, 1997) проведени при сперма от петли. В последно време се затвърди схващането, че е задължително да се следи селеновата обезпеченост на птичата сперма, тъй като Se е мощен модулатор на системата за антиоксидантна защита на сперматозоидите (**Pappas et al.**, 2005). Това налага едновременното следене както на нивото и активността на антиоксидантните компоненти в половите продукти, така и на морфо-функционалния интегритет на птичите гамети (**Jang Mei Jun**, 2009).

Още преди да са публикувани резултатите на **Douard et al.** (2004, 2005), ние извършихме редица изследвания (**Димитров и др.**, 2003; **Atanasov et al.**, 1999) за определяне на липидното съдържание (общи липиди, фосфолипиди и холестерол) в семенна плазма на свежа и съхранена сперма от петли и пуйци. При холестерола се наблюдава ясна тенденция за повишаване нивото при сперматозоидите от контролните групи на 6-ия час от съхраняването. Изглежда, заключението на **Douard et al.** (2004a; 2004b; 2005), че промените в липидното съдържание на спермалната плазма оказва решаващо влияние върху интегритета на пуешките гамети е вярно. Освен това авторите смятат, че фосфолипаза A_1 , фосфолипаза A_2 и лизофосфолипазата в спермата на пуйци са способни да предизвикат ендогенна хидролиза на фосфолипидите, което води до деградация на спермалните мембрани.

Посочените постижения на проучванията за значението на разгледаните фактори в областта на репродуктивната биология, са важен фрагмент от глобалните усилия на учените-спермолози за повишаване оплодителната способност на птичите гамети в условията на съвременното интензивно птицевъдство.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Атанасов, В.**, 1995. Проучване ефекта на новоразработени протективни среди за сперма от риби (*Salmo trutta m. fario* L., *Salmo irideus* G. и *Cyprinus carpio* L.) върху биоенергийния метаболизъм на гамети и техния фертилитет. Дисертация. Ст. Загора. 161 с.
2. **Атанасов, В., С. Георгиев, И. Борисов, Б. Бадаров**, 1996. Биологични и биохимични промени на съхранявана сперма от нерези. Межд. конф. "Всичко за свиневъдството", Сливен, 83-91.
3. **Атанасов, В.**, 2005. Влияние на спермопротективни среди върху енергийния метаболизъм, мотилитета и фертилитета на сперматозоиди от стопански ценни видове риби и птици. Дисертация (дсн). Ст. Загора. 336 с.
4. **Атанасов, В.**, 2008. Спермопротективни среди за изкуствено осеменяване на птици: исторически аспекти и биохимични механизми на въздействие. Животновъдни науки, XLV, №1, 90-102.
5. **Димитров, Ст., Атанасов В., Желязков Ж., Георгиев, С.**, 1995. Ефект от влиянието на кристалоидни среди върху някои биологични параметри и оплодителната способност на сперматозоиди от петли. Ветеринарна медицина, Супл. 44-46.

6. **Димитров, Ст., Атанасов В., Дишлянова Е., Облакова М., Лалев, М., 2003.** Ефект на нивото на витамин Е в дажбата на пуйци върху биологичната пълноценност на семенната течност. *Животновъдни науки*, №5, с.41-43.
7. **Георгиев, С., Димитров Ст., Атанасов В., Лалев М., Облакова М., Профирова З., 1998.** Биологична характеристика и оплодителна способност на криоконсервирана семенна течност от пуйци. Юбилейна научна сесия 50 години СУБ "Науката пред прага на новото хилядолетие", Пловдив, II, 395-398.
8. **Ashizawa, K., Imaizumi T., Okauchi K., 1990.** Effects of tetraphenylboron on the motility, oxygen consumption, and adenosine 5'-triphosphate content of fowl spermatozoa. *Poult Sci.*; 69 (9):1563-8.
9. **Ashizawa, K., Hashiguchi A., Tsuzuki Y., 1992.** Intracellular free Ca^{2+} concentration in fowl spermatozoa and its relationship to motility and respiration in spermatozoa. *J Reprod Fertil.*; 96 (1):395-405.
10. **Ashizawa, K., Tomonaga H., Tsuzuki Y., 1994a.** Regulation of flagellar motility of fowl spermatozoa: evidence for the involvement of intracellular free Ca^{2+} and calmodulin. *J Reprod Fertil.*; 101 (2):265-72.
11. **Ashizawa, K., Katayama S., Kobayashi T., Tsuzuki Y., 1994b.** Possible role of protein kinase C in regulation of flagellar motility and intracellular free Ca^{2+} concentration of fowl spermatozoa. *J Reprod Fertil.*; 101 (3):511-7.
12. **Ashizawa, K., Wishart G., Nakao H., Okino Y., Tsuzuki, Y., 1994c.** Inhibition of temperature-dependent immobilization of fowl spermatozoa at body temperature by an increased intracellular pH. *J Reprod Fertil.*; 101 (3):593-8.
13. **Ashizawa, K., Magome A., Tsuzuki Y., 1995.** Stimulation of motility and respiration of intact fowl spermatozoa by calyculin A, a specific inhibitor of protein phosphatase-1 and -2A, via a Ca^{2+} -dependent mechanism. *J Reprod Fertil.*; 105 (1):109-14.
14. **Ashizawa, K., Higashio, M., Tsuzuki, Y., 1998.** Effects of tyrosine kinase inhibitor on the motility and ATP concentrations of fowl spermatozoa. *Mol Reprod Dev.*; 49 (2):196-202
15. **Ashizawa, K., Tomita Y., Kanemaru C., Tsuzuki, Y., 2000.** In vitro effects of beta-carotene for the motility, ATP, and intracellular free Ca^{2+} concentrations of fowl spermatozoa. *Mol Reprod Dev.*; 56 (1):99-104.
16. **Ashizawa, K., Miyamoto M., Tsuzuki Y., 2000a.** The possible role of protein-carboxyl methylation in the regulation of flagellar movement of fowl spermatozoa. *Anim Reprod Sci.*; 28; 58 (1-2):137-46
17. **Atanasov, V., G. Zheljaskov, S. Dimitrov, S. Georgiev, 1993.** Effects of some semen extenders on the energy metabolism of cock spermatozoa. 10 Int.Symp.on Current Probl.in Avian Genetics, Nitra, 2-3.
18. **Atanasov, V., S. Georgiev, S. Dimitrov, 1998.** Seasonal biological and biochemical changes of chicken semen stored at $-196^{\circ}C$. VIII World Conf. On Animal Production, Seoul, II, 256-258.
19. **Atanasov, V., S. Dimitrov, E. Dischljanova, T. Angelova, 1999a.** Dynamics of some biochemical parameters in cocks semen during the productive periode and their relationship with the fertility. *Bulg.J.Agric.Sci.*, 5, 651-654.
20. **Atanasov, V., S. Dimitrov, I. Borisov, 1999b.** Acid-base characteristics of fresh and stored ($t + 10-15^{\circ}C/6$ hours) turkey semen. *Poultry Genetics Symp.*, Mariensee, 104-105.
21. **Atanasov, V., V. Gerzilov, Evg. Dyshlianova, 2007.** Comparison of biochemical parameters of Muscovy drake semen diluted and stored at $4^{\circ}C$ in three buffers, *Anim.Rep.Sci.*, 100, 329-337.
22. **Barna, J., Ashizawa K., Boldizsar H., Inoue M., 1998.** Effects of taurine on the motility and intracellular free Ca^{2+} concentration of fowl spermatozoa in vitro. *J Reprod Fertil.*; 114 (2):225-9.
23. **Blesbois E., Brillard J., 2007.** Specific features of in vivo and in vitro sperm storage in birds. *Animal*, 1:10, 1472-1481.
24. **Breque, C., P. Surai, J. Brillard, 2003.** Roles of antioxidants on prolonged storage of avian sperma-

- tozoa in vivo and in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, Volume 66, Issue 3, p. 314 - 323
25. **Cerolini, S., P. Surai, G. Mangiagalli, L. Cavalchini and R. Noble**, 2000. Effect of n-3 and n-6 fatty acid supplemented diets and vitamin E level on semen quality in cockerels, *British Poultry Sci.*, vol.41, Suppl. S9.
 26. **Cerolini, S., F. Pizzi, T. Gliozzi, A. Maldjian, L. Zaniboni and L. Parodi**, 2003. Lipid manipulation of chicken semen by dietary means and its relation to fertility: review, *World, s Poultry Science Journal*, vol. 59: 65-75.
 27. **Dimitrov, S., S. Georgiev and V. Atanasov**, 2000. A new diluent (I 8.5) and method for freezing turkey semen: fertility date. *British Poultry Science*. vol.41. suppl.sept.s.11.
 28. **Dimitrov, S., Atanasov, V., Surai P., Denev, S.** 2007. Effect of organic selenium on turkey semen quality during liquid storage. *Anim.Rep.Sci.*, 100, 311-317.
 29. **Douard, V., Hermier D., Magistrini M., Blesbois E.**, 2003. Reproductive period affects lipid composition and quality of fresh and stored spermatozoa in Turkeys. *Theriogenology*; 59 (3-4):753-64.
 30. **Douard, V., Gassama-Diagne, A. and Blesbois, E.**, 2004a. Activity of Phospholipases A and Lysophospholipase in Turkey Semen and Oviducal Fluid. *Poultry Science*, 83:1385-1393.
 31. **Douard, V., Hermier D., Magistrini M., Labbe C., Blesbois E.**, 2004b. Impact of changes in composition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. *Theriogenology*; 61(1):1-13.
 32. **Douard, V., Hermier D., Labbe C., Magistrini M., Blesbois E.**, 2005. Role of seminal plasma in damage to turkey spermatozoa during in vitro storage. *Theriogenology*.; 63 (1):126-37.
 33. **Fishinin V.I., Papazian T. T. and P. F. Surai**, 2008. Selenium in poultry nutrition. Current advances in selenium research and applications., 221-261
 34. **Edens, F., C. Parkhust and A. Sefton**, 2002. Selenomethionine from selenized yeast improves spermatozoa integrity. Abstracts of 91st Annual meeting, University of Delaware, Newark, Delaware, August 11-14, 2002; suppl.80: 90-91.
 35. **Jang Mei Jyun**. 2009. The effect of selenium on the expression on selenoprotein W and antioxidative enzymes in chickens. Ph Thesis., Asia University, Taiwan.
 36. **Kamp, G., Busselmann G., Lauterwein J.**, 1996. Spermatozoa: models for studying regulatory aspects of energy metabolism. *Experientia* 52, 487 - 494.
 37. **Lin, Y. F., S. J. Chang, J. R. Yang, Y. P. Lee and A. L. Hsu**, 2005. Effects of supplemental vitamin E during the mature period on the reproduction performance of Taiwan Native Chicken cockerels. *Br. Poult. Sci.* 46: 366-373.
 38. **Long, J. A. and M. Kramer**, 2003. Effect of vitamin E on lipid peroxidation and fertility after artificial insemination with liquid-stored turkey semen. *Poultry Sci.* 82: 1802-1807.
 39. **Maldjian, A., S. Cerolini, P. F. Surai and B.K. Speake B.K.**, 1998. The effect of vitamin E, green tea extracts and catechin on the in vitro storage of turkey spermatozoa at room temperature. *Poult. Avian Biol. Rev.* 9: 143-151.
 40. **McIndoe, W. and Lake, P.**, 1973. Proceedings: Aspects of energy metabolism of avian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*;35(3):592-3
 41. **Ochkur, S., Kopeika E., Suraj P., Grishchenko, I.**, 1994. The influence of cryopreservation on parameters of energetic metabolism and motility of fowl spermatozoa. *Cryobiology*; 31(3):239-44.
 42. **Pappas, A., F. Karadas, B. Speake, P. Surai and N. Sparks**, 2005. Detection and dietary manipulation of selenium in avian semen. *Brit. Poultry Sci.* 1: 60-61
 43. **Pinto, O., Amir D., Schindler H., Hurwitz S.**, 1984. Effect of pH on the metabolism and fertility of turkey spermatozoa. *J Reprod Fertil.*; 70(2):437-42.
 44. **Surai, P.F.**, 1983. Biochemical and functional changes in turkey tissues and sperm as a function of the

- levels of vitamins E and A in feed. Can. Sci. (PhD) Thesis. Ukrainian Poultry Research Institute, Borky, Ukraine.
45. **Surai, P. F.**, 1984. Lipid peroxidation in turkey semen. *Ptisevodstvo (Kiev)* 37: 58-59.
 46. **Surai, P., S. Cerolini, R. Noble, B. Speake, N. Sparks and J. Cloughley**, 1997. Spermatozoa Lipids: Protection from peroxidation by α -tocopherol. *Prostaglandins, leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 57: 263.
 47. **Surai, P. F.**, 1992. Vitamin E Feeding of poultry males, *Proc. XIX World's Poultry Congress*, vol. 1: 575-578.
 48. **Surai, P. F. and G. J. Wishart**, 1996. Poultry artificial insemination technology in the countries of the former USSR. *World's Poultry Science Journal*, vol. 52, 1, 28-43.
 49. **Surai, P., G. Wishart, B. Speake, R. Noble, A. MacPherson, N. Sparks, I. Ionov and I. Kostyuk**, 1997. Effect of vitamin E and selenium in cockerel, s diet on lipid peroxidation in the spermatozoa. *Proceedings of Spring Meeting, Scarborough, 26-27 March, 1997*: 47-48.
 50. **Surai, P., E. Kutz, G. Wishart, R. Noble and B. Speake**, 1997a. The relationship between the dietary provision of -tocopherol and the concentration of this vitamin in the semen of chicken: effects on lipid composition and susceptibility to peroxidation. *J. Reprod. Fert.* 110: 47-51.
 51. **Surai, P. F., E. Blesbois, I. Grasseau, T. Ghalah, J. P. Brillard, G. Wishart, S. Cerolini and N. H. C., Sparks**, 1998. Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. *Com. Biochem. Physiol.* 120B: 527-533.
 52. **Surai, P. F., Cerolini S., Maljian R., C. Noble and B. K. Speake**, 1998a. Effect of lipid peroxidation on the phospholipid and fatty acid composition of turkey spermatozoa: a protective effect of vitamin E. *Proceedings of the 50th International Congress on Animal Reproduction, Milano*, p. 603.
 53. **Surai, P. F., S. Cerolini, G. J. Wishart, B. K. Speake, R. C. Noble and N. H. C., Sparks**, 1998b. Lipid and antioxidant composition of chicken semen and its susceptibility to peroxidation. *Poultry Avian Biol. Rev.* 9: 11-23.
 54. **Surai, P. F., I. A. Kostjuk, G. Wishart, A. MacPherson, B. Speake, R. C. Noble, I. A. Ionov and E. Kutz**, 1998c. Effect of vitamin E and selenium of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes and liver. *Biol. Trace Elem. Res.* 64: 119-132.
 55. **Surai, P. F., J. P. Brillard, B. K. Speake, E. Blesbois, F. Seigneurin and N. H. C. Sparks**, 2000. Phospholipid fatty acid composition, vitamin E content and susceptibility to lipid peroxidation of duck spermatozoa. *Theriogenology* 53: 1025-1039.
 56. **Surai, P. F., R. C. Noble, N. H. C. Sparks and B. K. Speake**, 2000a. Effect of long-term supplementation with arachidonic and docosahexaenoic acids on sperm production in the broiler chicken. *J. Reprod. Fert.* 120: 257-264.
 57. **Surai, P. F.**, 2002. *Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction*. Nottingham University Press, Nottingham.
 58. **Surai, P. F.**, 2003. Selenium-vitamin E interactions: Does 1+1 equal more than 2?. In: *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries*. *Proc. of Alltech's 19th Annual Symposium (T.P. Lyons and K.A. Jacques, eds.)*. Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp.59-76.
 59. **Wishart, G. J.**, 1982. Maintenance of ATP concentrations in and of fertilizing ability of fowl and turkey spermatozoa in vitro. *J Reprod Fertil.*;66(2):457-62.
 60. **Wishart, G. J.**, 1984. Metabolism of fowl and turkey spermatozoa at low temperature. *J Reprod Fertil.*; 70:145-149.

e-mail: vka@mail.bg,