



## ВЛИЯНИЕ НА ФАКТОРИ НА ОКОЛНАТА СРЕДА ВЪРХУ КРИОРЕЗИСТЕНТНОСТТА НА СПЕРМАТОЗОИДИ ОТ ЕЯКУЛАТИ НА КОЧОВЕ, ПОЛУЧЕНИ ПРЕЗ ИЗВЪНРАЗМНОЖИТЕЛЕН СЕЗОН

ХР. ХРИСТЕВ,<sup>1</sup> И. НИКОЛОВ, М. СЪБЕВ, М. ИВАНОВА-КИЧЕВА,  
Р. СТЕФАНОВ, П. РАШЕВ

<sup>1</sup>Аграрен Университет – Пловдив, ИБИР “Акад. К. Братанов” БАН

## INFLUENCE OF SOME ENVIRONMENTAL FACTORS ON CRYORESISTANCE OF SPERMATOOA OF RAMS- EJACULATES DURING A NON-REPRODUCTIVE SEASON

Hr. Hristev\*, I. Nikolov, M. Sabev, M. Ivanova-Kicheva, R. Stefanov, P. Rashev

\*Agricultural university- Plovdiv; Institute of biology and immunology of reproduction

“Acad. K. Bratanov”- BAS

E-mail: hrh.1234@abv.bg

### Abstract

Experiments for cryopreservation of ram's sperm, received in non-reproductive season (April-May) have been conducted. There are to observe some differences regarding the biological indexes of the sperm. The same are to explain with the influence of the ecological factors- temperature, continuance of the luminous day, relatively humidity. The ejaculates, got in non-reproductive season are characterized with non significant reduced cryoresistance of the spermatozoa. That is a base for successful cryopreservation of sheep's genetic material out of reproductive season.

**Keywords:** rams, sperm, cryopreservation, nonreproductive season

Комплексът от природогеографски фактори в България е в оптимални граници за местообитаване на домашните представители от вида *Ovis aries* и благоприятства за широкото развитие на овцевъдството. Във всички райони на страната, съобразно с почвено-климатичните, релефни и икономически условия, се отглеждат високопродуктивни породи овце. Това изисква намиране на подходи за достигане на генетично заложените породни възпроизводителни способности на животните. С прилагането на прогресивната технология за изкуствено осеменяване на овце, изключително нараства ролята на ценните разплодници, а заедно с това и на възможностите за продължителното им използване като спермопроизводители, както в размножителния, така и в извънразмножителния сезон. Възможности за оптимално използване на генетичен материал от такива кочове съществуват, ако успешно се

криоконсервират и съхраняват еякулати, получавани целогодишно. Срещаните литературни данни се отнасят до проблемите за дълбоко замразяване на сперма от този вид, в условия на ултранисък температурен режим – 196 °С [6].

Ролята на сезона за получаване на еякулати, както и отражението му върху криотолерантността на гаметите от коч, са слабо проучени. [3] устано-вяват промени в количеството на някои белтъци от спермалната плазма и криотолерантността на сперматозоидите от коч в зависимост от сезоните. У нас [5] са известни ограничени изследвания върху замразяване на сперма от някои аборигенни породи кочове, получена в извънслучен сезон. Недостатъчните данни за отражението на някои фактори на околната среда, като температура, влажност и продължителност на светлинния ден върху криотолерантността на сперматозоидите от коч и установената им висока чувствителност към нискотемпературната анабиоза, мотивираха проучванията ни в тази насока.

#### **МАТЕРИАЛ И МЕТОД**

Опитите са проведени върху 23 еякулата (I+II-ри) – 10 броя през размножителния сезон (август-септември) и 13 броя – през извънразмножителния сезон (април - май). Еякулатите са получени от 3 коча – Североизточна тънкорунна порода по метода на изкуствената вагина. Разплодниците са отглеждани и хранени при еднакъв режим, съгласно нормативните изисквания, включващи и ежедневна паша. Сперматологичните изследвания обхващат показателите: обем на еякулата (см<sup>3</sup>), концентрация на сперматозоидите (10<sup>9</sup> /см<sup>3</sup>), подвижност (%), патологични сперматозоиди (%), и рН по съответните методи [9, 10]. Прогнозата, относно годността на еякулатите за криоконсервация, е преценена чрез теста за криорезистентност на сперматозоидите към температурен шок (РСТШ) [2]. Оценените с възможност за замразяване еякулати са разреждени в патентованата среда Triladil (Minitube), включваща 25% яйчен жълтък, в съотношение 1:4, с оглед в доза размразена сперма да се осигурят до 80 млн подвижни сперматозоиди. Криоконсервацията на спермата е извършена по гранулната технология на Nagase-Niwa, като гранулите са съхранявани в течен азот при –196° С. След размразяване в 2.8 % цитратен буфер спермата е оценявана по показателите –обща подвижност на сперматозоидите (ОПС%), сперматозоиди с праволинейно настъпателно движение (СПНД%) и сперматозоиди с морфологични изменения (СМИ%). Проведен е тест за термична резистентност на сперматозоидите при 39°С, като мотилитета е проследен на всеки 60 min до 300-та min [7, 9, 10]. Проведени са изследвания за определяне пенетрационната способност на сперматозоидите след криоконсервация. Взети са предвид средните стойности на следните фактори на околната среда: месечна, минимална и максимална температура, относителна влажност на въздуха и продължителност на светлинния ден, характеризиращи съответните периоди август-септември и април-май.

Данните от изследванията са обработени вариационно – статистически по Student.

#### **РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ**

От проведената комплексна оценка на изследваните биологични показатели на 13 броя еякулата, получени през извънразмножителен сезон, 10 броя са със стойности, които ги характеризират като нормозооспермични, докато от 10 еякулата, получени през размножителния сезон, само 1 е с отклонения в сперматологичните параметри (таблица 1).



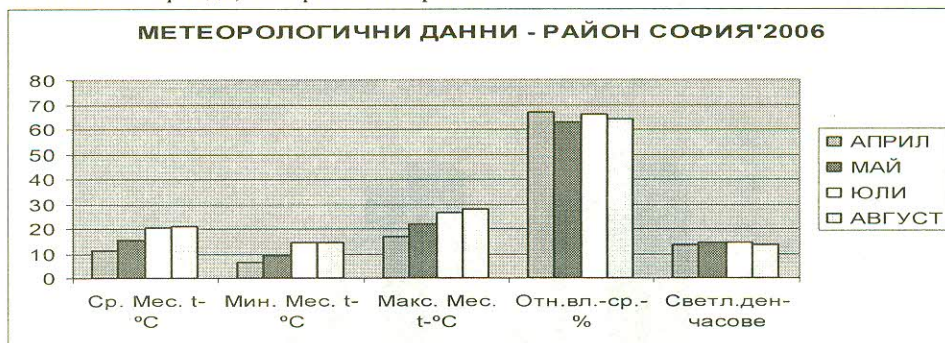
От таблицата се вижда, че еякулатите, получени през извънразмножителния сезон са с по-ниски стойности за определени показатели, в сравнение с тези, получени в размножителния сезон. Установени са достоверни различия по отношение на подвижността на сперматозоидите ( $p \leq 0.05$ ) и % патологични сперматозоиди ( $p \leq 0.01$ ).

Таблица 1  
Биологични качества на сперма от кочове, получена в размножителен и извънразмножителен сезон

Сезон	Показатели							
	Еякулати (n)	обем (cm <sup>3</sup> )	подвижност(%)	концентрация (млрд/cm <sup>3</sup> )	патологични, %	pH	Бракувани еякулати	
							бр.	%
Извънразмножителен	13	1.31±0.07	81.3±1.58*	2.69±0.08	24.9±1.80**	6.76±0.04	3	23.07
Размножителен	10	1.34±0.06	86.1±1.63*	2.58±0.01	8.3±1.50**	6.74±0.03	1	10.00

\* $p \leq 0.05$  и \*\* $p \leq 0.01$

Изследваните стойности за факторите на околната среда – температура на въздуха, относителна влажност и продължителност на светлинния ден, съответстващи на опитните периоди, са отразени на фиг. 1.



При получените през извънразмножителния сезон еякулати, средните месечни температури за м април са били около 11.2 °C, а за месец май-15.5 °C. Значително по-високи са били регистрираните стойности през размножителния сезон (юли-август), съответно 20-21 °C.

Относителната влажност на въздуха, както и продължителността на светлинния ден по време на извън размножителния и размножителния периоди са били приблизително еднакви.

От извършените проучвания върху резистентността на сперматозоидите от коч към температурен шок (таблица 2) се установи, че от окачествените като нормоспермични 10 броя еякулати, получени през

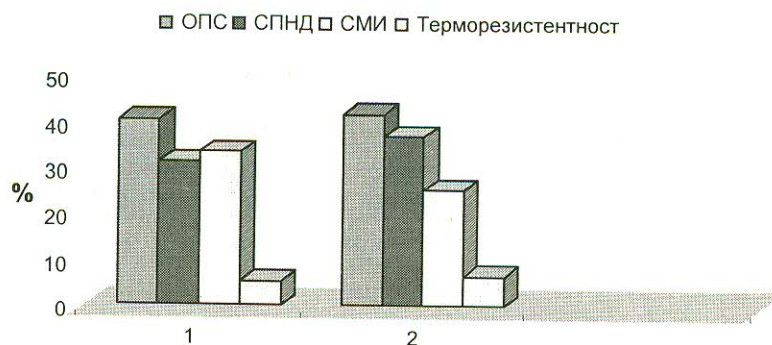
Таблица 2

Резистентност на сперматозоиди от коч към температурен шок

Сезон	n	Коефициент на студоустойчивост на сперматозоидите		Брак	
		$\geq 0.30$	$\bar{x} \pm Sx$	бр.	%
Извън размножителен	10	8	$0.36 \pm 0.04$	2	20.0
Размножителен	9	9	$0.41 \pm 0.05$	-	-

извънразмножителния сезон, 8 броя са с висока резистентност ( $\geq 0.30$ ) към понижаване на температурата (от  $39^{\circ}$  до  $0^{\circ}\text{C}$ ). При тях средната стойност на коефициента РСТШ е  $0.36 \pm 0.04$ , което дава основание те да бъдат използвани в опитната постановка за криоконсервация. Получените през размножителния сезон 9 нормоспермични еякулата се характеризират с по-високи стойности за изследвания коефициент  $0.41 \pm 0.05$ , позволяващи също да бъдат замразени.

Резултатите от опитите за криоконсервация на спермата показват, че при използваната технология за криоконсервация в гранули, след размразяване, са налице известни различия по отношение на биологичните показатели СПНД и СМИ в зависимост от сезона на получаване (Фигура 2).



Фигура 2. Биологични показатели на сперматозоиди от коч, получени в извънразмножителен – 1 (n=8) и размножителен сезон – 2 (n=9).

Мотилитетът на сперматозоидите, замразени и размразени през размножителния сезон е по-висок с 5.7% ( $p \leq 0.05$ ), в сравнение с тези стойности на сперматозоидите, получени през извънразмножителния сезон. Подобни разлики се установяват и при сперматозоидите с морфологични изменения (СМИ) – 8.1% ( $p \leq 0.05$ ).



За останалите два показателя (ОПС и Терморезистентност) не се установяват достоверни разлики. Тези данни показват, че сезоните оказват известно влияние върху криотолерантността на гаметите, но също, че е възможна успешна криоконсервация и през извънразмножителния период.

Таблица 3

Пенетрационна способност на сперматозоиди от коч след криоконсервация и размразяване

Сезон	n	Пенетрация mm/20 min $\bar{x} \pm S_x$	p
Извънразмножителен	8	16.9±0.8	≤0.01
Размножителен	8	19.9±0.7	

Пенетрационната способност на размразените сперматозоиди показва зависимост от сезона на получаване на еякулатите. При замразяване през размножителния сезон, след деконсервация, сперматозоидите имат по-висока пенетрационна способност с 3.1 mm/20 min ( $p \leq 0.01$ ), в сравнение с тази през извънслучния сезон.

Получените данни дават основание да се приеме, че и в двата изпитвани сезона сперматозоидите от кочове могат да бъдат замразявани успешно, независимо от установените различия в биологичните параметри, което позволява достигане на значителен икономически ефект. Това може да се осъществи след прецизен предварителен подбор на еякулатите.

Използването на разплодниците изисква познаване на техните физиологични и биологични способности, както и начините и пътищата на реакция на организма им към комплекса от фактори на заобикалящата ги среда. Ето защо особено внимание при отглеждане на кочовете трябва да се даде на анализа по оценката на факторите на външната среда, които с постоянните си колебания стимулират адаптационните механизми у животните и допринасят за тяхното запазване и продуктивност [11]. Резултатите от проведените изследвания показват, че взаимодействието между организма и средата индуцира адаптация към промените на факторите на външната среда. Някои автори са провели изследвания чрез осеменяване на овце в извънразмножителен период и резултатите показват възможност за адаптиране на породи от различни климатични области [8]. Независимо от този принцип се наблюдават индивидуални различия, както в спермопродукцията, така и по отношение на криорезистентността на гаметите в отделните еякулати. Подобни резултати са установени от [1], които изказват становището, че сезоните оказват значително влияние върху замразяемостта на гаметите от кочове. Също така, [4] установява значително нарастване на интактните акрозоми и подвижността на сперматозоидите в размножителния сезон, в сравнение с извънразмножителния.

Познаването на особеностите при формирането на естествената устойчивост при разплодните кочове, в резултат на въздействие на външни фактори на заобикалящата ги среда, създават предпоставки за запазване на репродуктивната им способност и през извънразмножителния сезон.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

От проведените изследвания за криоконсервация на сперма от кочове, получена през извънразмножителен сезон се установява, че съществуват различия в стойностите за показатели на спермограми, отнасящи се до подвижност на сперматозоидите ( $p \leq 0.05$ ) и наличие на патологични сперматозоиди ( $p \leq 0.01$ ), в сравнение със стойностите им за еякулати, получени през размножителния сезон. Резултатите се интерпретират с влиянието на изследваните фактори на околната среда.

След подбор на еякулати, получени през извънразмножителен сезон, е възможна успешна криоконсервация на сперма, с оглед съхраняване на генетичен материал от кочове.

## ЛИТЕРАТУРА

1. D'Alessandro AG, Martemucci G. Evaluation of seasonal variation of semen freezability in Leccese ram. *Anim Reprod Sci* 2003, 79:93-102.
2. Ostashko F. Deep freezing and protection animal semen. (1978), "Urojai", Kiev.
3. Perez-Pe R, Muino-Blanco T, Cebrian-Perz JA. Sperm washing method alters the ability to revert the cold-chok damage on ram sperm membrane. *Int Androl*, 2001, 24, (6): 352-9.
4. Purdy PH. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 hours at 5°C prior cryopreservation. *Anim Perod Sci* 2006, 93:114-123.
5. Sabev M, Nikolov I, Ivanova-Kicheva M, Stefanov R, Chenshirova Ts, Baycheva E, Popova M. Cryopreservation of ram sperm from autochthonous breeds during a non-mating season. *Journal Central European Agriculture* 2006 vol. 6, issue 5: 233-239.
6. Salomon S, Maxwell WM. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Perod Sci* 1995, 38: 1-36.
7. Thun R, Hurtado M, Jannet F. Comparison of biociphos and Triss-egg yolk extender for cryoconservation of bull semen. *Theriogenology* 2002, 57, 1087-94.
8. Yataka F, Kenji I, Okada A, Yokio Z, Sachiko W, Marihiko T. Fertility of estrus-induced ewes during the non-breeding season and artificial insemination with frozen semen imported from New Zealand. *J Repro and Dev* 2002, 5: 485-488.
9. Димитров С, Бонев Г, Георгиев Ст, Атанасов В., 2000 Методи за преценка и контрол на оплодителната способност на семенна течност. Изд. СОК- CAR Universe, Ст. Загора
10. Семков М, Николов И, Манолов И. Ръководство за упражнения по биология на размножаването и изкуствено осеменяване на с.с. животни. Земиздат, София, 1989.
11. Христов Х. Естествена устойчивост при животните. Акад Изд. На АУ, Пловдив, 2007.