



**ДИНАМИКА В МОРФОФУНКЦИОНАЛНИТЕ ПАРАМЕТРИ НА СПЕРМАТОЗОИДИ ОТ КОЧ ОТ ПОРОДАТА СИНТЕТИЧНА ПОПУЛАЦИЯ БЪЛГАРСКА МЛЕЧНА В ЗАВИСИМОСТ ОТ СЕЗОНА И ИНДИВИДУАЛНИТЕ ИМ ХАРАКТЕРИСТИКИ**  
**DYNAMICS OF MORPHOFUNCTIONAL PARAMETERS OF RAM SPERM - BREED SYNTHETIC POPULATION BULGARIAN DAIRY DEPENDING ON SEASON AND INDIVIDUAL CHARACTERISTICS**

**Росен Стефанов<sup>1\*</sup>, Елена Кистанова<sup>1</sup>, Никола Методиев<sup>2</sup>, Димитрина Качева<sup>1</sup>, Емилия Райчева<sup>2</sup>,  
Бойко Георгиев<sup>1</sup>, Паулина Таушанова<sup>1</sup>**  
**Rossen Stefanov<sup>1\*</sup>, Elena Kistanova<sup>1</sup>, Nikola Metodiev<sup>2</sup>, Dimitrina Kacheva<sup>1</sup>, Emilia Raicheva<sup>2</sup>, Boyko Georgiev<sup>1</sup>,  
Paulina Taushanova<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт по биология и имунология на размножаването – БАН, София

<sup>2</sup>Институт по животновъдство – Костинброд

<sup>1</sup>Institute of Biology and Immunology of Reproduction – BAS, Sofia

<sup>2</sup>Institute of Animas Science – Kostinbrod

**\*E-mail: stefanovrossen@gmail.com**

### **Резюме**

Анализът на еякулата на даден разплодник е с ключово значение за отбора на индивидите по отношение на техните репродуктивни качества. Този анализ включва както функционалната характеристика на сперматозоидите, изразена чрез определяне на техния мотилитет и активността на някои ключови ензими (ЛДХ, ГГТ), така и морфологичните параметри на мъжките гамети в даден еякулат. Целта на настоящото изследване е да се установи как сезонът и последователността на получаване на еякулата влияят върху морфофункционалните параметри на сперматозоиди от разплодници от породата Синтетична популация българска млечна. В експериментите са използвани 5 клинично здрави коча от породата. От всеки разплодник са получавани по три последователни еякулата, през три сезона – пролет, лято и есен. За сперматологичните изследвания с цел определяне мотилитета на сперматозоидите и морфологичните им параметри е използван Sperm Class Analyzer (Microptic Systems). Биохимичната активност на ензимите ЛДХ и ГГТ е определена чрез автоматичен спектрофотометър Mindrai BA 88. През пролетния период в еякулатите са наблюдавани занижени показатели както по отношение на мотилитета на сперматозоидите, така и по отношение на активността на основните изследвани ензими. В същото време е установен и по-голям процент сперматозоиди с морфологични отклонения. Еякулати със значително по-добри стойности по отношение на всички изследвани показатели са получени при експериментите през лятото и есента. По-големи различия в качеството на еякулатите са наблюдавани между отделните разплодници, в сравнение с различията между последователни еякулати на един разплодник. Индивидите с високи стойности на изследваните параметри ги запазват в последователните еякулати. Получените резултати позволяват да се направи извода, че качеството на спермата в по-висока степен зависи от сезона, отколкото от последователността на получаването на еякулати.

### **Abstract**

The analysis of the ejaculates of a sire is a crucial for the selection of individuals in terms of their reproductive qualities. This analysis includes functional characteristics of sperm: motility and activity of key enzymes (LDH, GGT) as well as the morphological parameters of male gametes. The aim of this study was to determine how the season and consecutive of ejaculate affect morphofunctional parameters of ram sperm from the breed Synthetic Population Bulgarian Dairy. In the experiments five clinically healthy rams were used. There were obtained three consecutive ejaculates for each sire in three seasons - spring, summer and autumn. For the estimation of sperm motility and morphological parameters the Sperm Class Analyzer (Microptic Systems) was used. The biochemical activities of the enzymes LDH and GGT were determined by spectrophotometer - Mindrai BA 88. During the spring period in all ejaculate decreasing of the sperm quality in terms of sperm motility, was observed as well as the activity of tested enzymes. At the same time higher percentage of sperm with morphological abnormalities was observed. Ejaculates with good values of studied parameters were obtained from experiments in summer and autumn. Divergence in the quality of the ejaculates is more expressive between different sire, than between consecutive ejaculates of one sire. Individuals with high values of the studied parameters keep them in

all consecutive ejaculates. The obtained results allow concluding that the quality of sperm depends more on the season than on the consecution of ejaculate.

**Ключови думи:** сперматозоиди, коч, мотилитет, ензимна активност.

**Key words:** sperm, ram, motility, enzyme activity.

## ВЪВЕДЕНИЕ

Половата система на коча се подлага на циклични промени, причинени от фотопериодите през годишните времена, което се явява основен фактор на околната среда, контролиращ сезонността на репродукцията (Hafez, 2000; Kaaya et al., 2000). Като цяло качеството на производството на сперматозоиди е по-високо през есента и лятото, отколкото през пролетта или зимата. Изследванията на Guerin et al. (1992) показват, че има сезонно влияние върху преживяемостта на спермалните клетки и оплодителната им способност.

Анализът на еякулата на даден разплодник е с ключово значение за отбора на индивидите по отношение на техните репродуктивни качества. Този анализ включва както функционалната характеристика на сперматозоидите, изразена чрез определяне на техния мотилитет и активността на някои ключови ензими (ЛДХ, ГТТ), така и морфологичните параметри на мъжките гамети в даден еякулат. Известно е, че качеството на еякулата зависи и от поредността на получаването. Например според някои автори (Kaaya et al., 2002) мотилитетът на сперматозоиди, получени от кочове от породата Мутон Мерино, се редуцира при всеки следващ еякулат. Според други автори обаче се наблюдава по-висок мотилитет при втория получен еякулат в сравнение с първия. Такава закономерност са установили Nel-Themaat et al. (2006) при кочове от местна холандска порода. Тенденция към повишаване подвижността на сперматозоидите е констатирана при последователното получаване на еякулати и от кочове от породата Ил дьо Франс (Kistanova et al., 2007). По отношение на кочове от породата Синтетична популация българска млечна (СПБМ) данни за проучване на сезонни промени в качеството на спермата и влиянието на последователността на получаване на еякулата върху биологичните характеристики на мъжките гамети не бяха намерени.

Целта на настоящото изследване беше проследяване на влиянието на сезона и последователността на получаване на еякулата върху морфофункционалните параметри на сперматозоиди от разплодници от породата Синтетична популация българска млечна.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

В експериментите бяха използвани 5 клинично здрави коча от породата СПБМ, отглеждани в опитната

база на ИЖН – Костинброд. Количествената и качествената оценка на спермата беше направена през различни сезони – пролет, лято и есен. В деня на опита от всеки разплодник, с помощта на изкуствена вагина, бяха получавани по три последователни еякулата, след което бяха разреждани в съотношение 1:3 със среда 6А. След това пробите бяха поставени в термос и незабавно транспортирани в лабораторията на ИБИР – БАН за анализ.

За сперматологичните изследвания с цел определяне мотилитета на сперматозоидите и морфологичните им параметри беше използван компютърен спермоанализатор (Sperm Class Analyzer Microptic Systems, Nikon Eclipse E200). Чрез оцветяване на сперматозоидите със Sperm Blue по определен протокол бяха анализирани полови клетки с различни морфологични дефекти: пречупени опашки, наличие на цитоплазмени капчици, липса на акрозома, нарушена плазмемембрана.

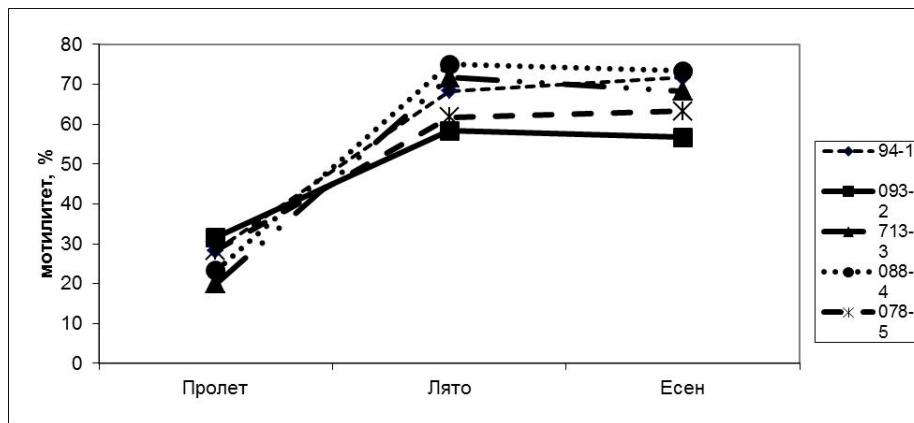
След анализа на пробите семенна течност чрез компютърния спермоанализатор всеки еякулат беше разделян на части, като една част беше отделена за обработка и извличане на сперматозоидните протеини. Плазмата беше отделяна чрез центрофугиране, пелета от сперматозоиди беше промивана трикратно с физиологичен разтвор и впоследствие замразявана при температура  $-20^{\circ}\text{C}$  за 24 ч. След размразяването пелетата беше сонифицирана чрез ултразвук трикратно за по 10 секунди и беше центрофугирана при 12 000 g за 30 мин. при температура  $4^{\circ}\text{C}$ . Получената супернатанта беше подложена на биохимичен анализ за определяне на активността на ензимите ЛДХ и ГТТ чрез автоматичен спектрофо-тометър Mindrai BA 88.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

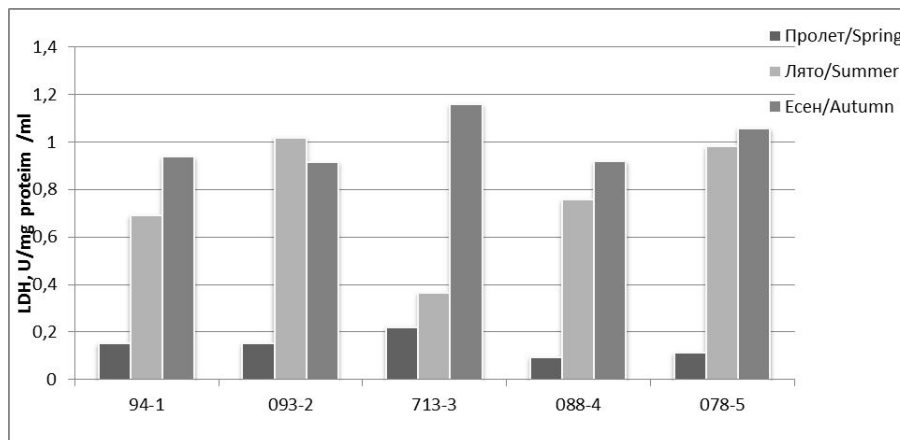
### Резултати

Анализът на параметрите подвижност на сперматозоидите, отразени на фиг. 1, 2, и 3, показват следните резултати.

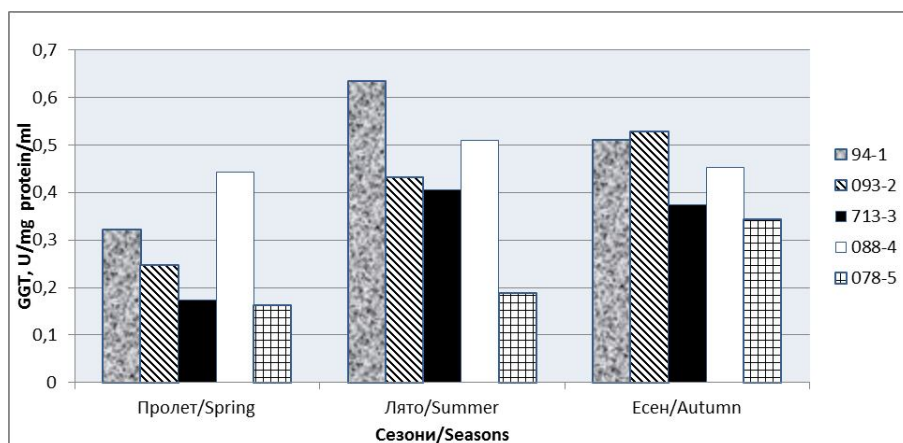
Индивидуални и сезонни разлики са наблюдавани по отношение на мотилитета на сперматозоидите. Най-ниски стойности са наблюдавани през пролетта, последвани от нарастване през лятото до есента. Интересно е да се отбележи, че кочовете с най-лоши показатели (кочове № 713 и № 088) по отношение на мотилитета през пролетта, показват достоверно по-



Фиг. 1. Мотилитет на сперматозоиди от еякулати на кочове, получени през различни сезони  
 Fig. 1. Spermatozoa motility from ram's ejaculates obtained during the different seasons



Фиг. 2. Активност на ензима ЛДХ в сперматозоиди от еякулати, получени през различни сезони  
 Fig. 2. LDH activity in the spermatozoa from the ejaculates obtained during the different seasons



Фиг. 3. Активност на ензима ГТТ в сперматозоиди от еякулати, получени през различни сезони  
 Fig. 3. GGT activity in the spermatozoa from the ejaculates obtained during the different seasons

високи стойности през лятото и есента в сравнение с другите разплодници.

Стойностите на втория изследван параметър, а именно активността на ензимите ЛДХ и ГГТ в еякулатите през пролетта, лятото и есента, са представени на фиг. 2 и 3. Тези показатели отразяват метоболитната активност на сперматозоидите. Данните показват, че ЛДХ активността в сперматозоидите е тясно свързана със сезонните промени. По отношение на ензима ГГТ не беше установено влияние на сезона върху неговата активност. Варирането на стойностите се дължеше на индивидуалните особености на разплодниците.

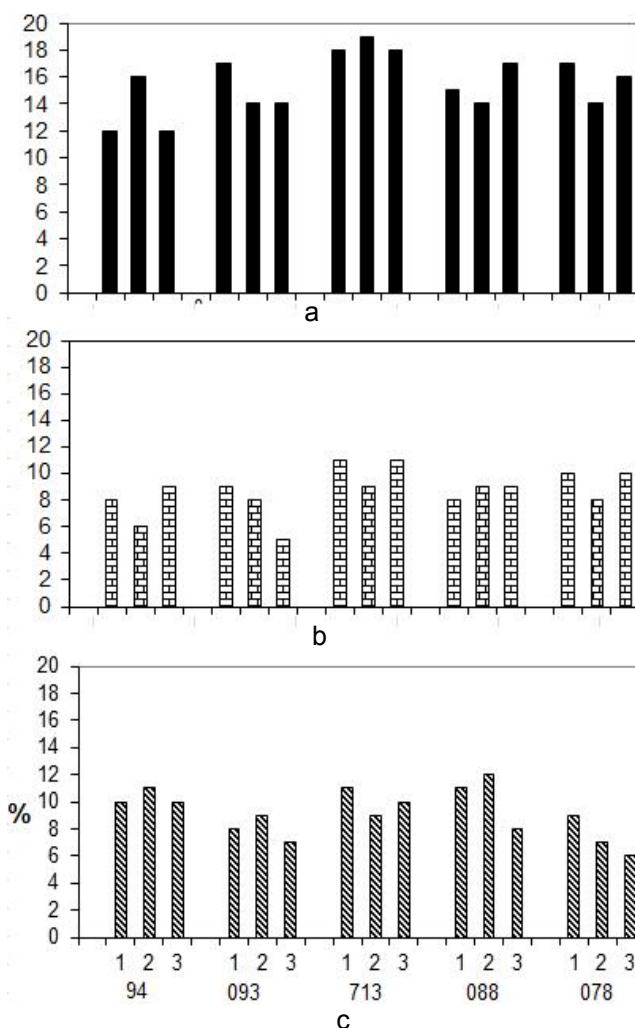
На фиг. 4 е показан процентът на сперматозоиди с различни морфологични дефекти в последователни еякулати, получавани през трите сезонни периода. Най-висок процент патологични сперматозоиди се наблюдават в еякулатите, получени през пролетта (от 12% до 19% на еякулат срещу 5-11% през лятото и 6-12% през есента).

#### Обсъждане

Еякулати със значително по-добри стойности по отношение на всички изследвани показатели бяха получени при експериментите през лятото и есента. Представените резултати са в унисон с тези на Gündoğan (2007), който отбелязва, че обемът на еякулата и концентрацията на сперматозоидите са по-високи през есента в сравнение с другите годишни времена. D'alessandro et al. (2001) откриват за други породи овце намален брой на патологичните сперматозоиди в семенна течност, събрана през лятото и есента. Същата сезонна цикличност беше наблюдавана и в нашия експеримент.

Намаляването на концентрацията и обема на спермата може да се отдаде на намалената функция на хипофизната жлеза и тестисите поради намаляване на техните размери в извънразмножителния период (Hamidi et al., 2010). По-големи различия в качеството на еякулатите се наблюдават между отделните разплодници, а между последователните еякулати от един разплодник различията са незначителни. По наши данни сезонът и последователността на получаването на еякулата също не оказват влияние върху обема му.

Настоящото изследване показва значително по-ниска подвижност на спермалните клетки през пролетта в сравнение с есента. Този факт може да бъде причинен от редица фактори, включително сезонните колебания на хормоналния профил, структурните варианти на лайдиговите и сертолиевите клетки през различните фотопериоди на годината (Dorostgoal, 2006). В частност, профилът на мъжките полови хормони играе важна роля в сперматогенезата (Johnson et al., 1973; Sanford et al., 1974).



Фиг. 4. Процент патологични сперматозоиди в последователни еякулати, получени през различни сезони: а) пролет; б) лято; в) есен

Fig. 4. Percent of morphologically destroyed spermatozoa in the consecutive ejaculates obtained during the different seasons: a) spring; b) summer; c) autumn

Дейността на андрогензависимите ензими ЛДХ и ГГТ са повлияни от сезонната промяна. Тези промени се отразяват и върху функциите на сперматозоидите. Увеличеният процент живи и морфологично нормални сперматозоиди отговаря на повишена активност на ЛДХ в семенната течност. Тези резултати са сходни с данните, получени от Zamiri and Khodaei (2005). Установено е, че този ензим играе съществена метаболитна роля в сперминалната капацитация и фертилизация. Функцията на ГГТ не е добре дефинирана. Ензимът е специфичен маркер на спермата. Играе важна роля в окислително-редукционния баланс и изпълнява антиоксидантна защита по време на преноса и съхранението на сперматозоидите в епидидиума (Hinton et al., 1991).



Понижените му нива корелират с намалена жизнеспособност на сперматозоидите. Някои автори съобщават за незначителни корелации между нивата на ГТТ и показателите обем, плътност и мотилитет на спермата (Awadallah et al., 2003).

Нашите резултати показват средно повишена активност на изследваните ензими през лятото и есента в сравнение с пролетта. В същото време в границите на един сезон се проявява широка индивидуална вариабилност по отношение на активността на ГТТ и ЛДХ.

### ИЗВОДИ

1. През лятото и есента при всички кочове са установени еякулати със значително по-добри стойности по отношение на изследваните показатели. Средната подвижност на сперматозоидите варира от 60 до 80% през лятото, от 55 до 75% през есента, спрямо 25-35% през пролетта. Процентът на сперматозоидите с нормална морфология е над 90% през лятото и есента и до 80% през пролетта.
2. По-големи различия в качеството на еякулатите се наблюдават между отделните разплодници, отколкото между последователни еякулати от един разплодник. Така например разликите в мотилитета на сперматозоидите при отделни разплодници достигат до 15%, а между отделните еякулати, получени от един коч, не повече от 5%.
3. В границите на един сезон индивидите с високи стойности на мотилитета го запазват и в последователните еякулати.

### LITERATURA

- Awadallah, M., Nuha M Salem, Suleiman A Saleh, Mohammad S Mubarak, Ali Z Elkarmi, 2003. Zinc, Magnesium and Gamma Glutamyltransferase levels in Human Seminal fluid. Bahrain Medical Bulletin, Vol. 25, No 3, 1-8.
- D'alessandro, A. G., M. A. Collona, A. Bellitti, G. Martemucci, 2001. Variations during the year in quantitative and qualitative semen characteristics in Leccese rams. Zootecnia e Nutrizione Animale, Bologna, v. 27, 221-230.
- Dorostgoal, M., 2006. Histological and morphometrical studies of seminiferous tubules and leydig cells of Khouzestan Arabian rams in different seasons of a year by light and electron microscope. University of Shahid Chamran, Ahwaz, Iran, 74-122.

- Guerin, Y., Y. Cognie, N. Poulin, 1992. Freezability of freshly ejaculated and frozen ram semen in vitro. In: International Congress on Animal Reproduction, 12., The Hague: ICAR, v. 3, 1418-1420.
- Hafez, ESE, 2000. Reproduction in farm animals. 7th Ed, Lea and Febiger, Philadelphia, USA, 160-270.
- Hamidi, A, M. Mamouei, Kh. Mirzadeh, S. Tabatabaei, H. Roshanfekr, 2010. Seasonal changes of blood GH concentration and its association with reproductive parameters in Arabian breed ram. Proc 4th Iranian Cong Anim Sci, Tehran, September 20-21, p. 426.
- Hinton, B.T., M.A. Palladino, D.R. Mattmueller, D. Bard, K. Good, 1991. Expression and activity of gamma-glutamyl transpeptidase in the rat epididymis. Mol Reprod Dev., 28:40-46.
- Johnson, B.H., C. Desjardins, L. Ewing, 1973. Seasonal effects on testis function in rams. Anim Sci, 37, p. 247.
- Kaya, A, M. Assoy, T. Tekeli, 2002. Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in ram. Small Rumin. Res., 44 :153-158.
- Kaya, A., N. Baspinar, C. Yildiz, F. Kurtoglu, M.B. Ataman, S. Haliloglu, 2000. Influence of melatonin implantation on sperm quality, biochemical composition of the seminal plasma and plasma testosterone levels in rams. Rev Med Vet, 151: 1143-1146.
- Kistanova, E., D. Vasileva, B. Grigorov, N. Metodiev, 2007. The morphological and biochemical characteristics of the consecutive ejaculates from Il de France rams at various ages. Biotech. Anim. Hunsb., 23: 301-310.
- Nel-Themaat, L., G. Harding, J. Chandler, J. Chenevert, P. Damiani, J. Fernandez, P. Humes, C. Pope, R. Godke, 2006. Quality and freezing first and second ejaculates collected from endangered Gulf Coast Native rams. Anim. Reprod. Sci., 95: 251-261.
- Sanford, L. M., W. M. Palmer, B. E. Howland, 1974. Seasonal variation of serum levels of LH and testosterone in the ram. Anim Sci, 54: 247-252.
- Zamiri, M. J., H. R. Khodaei, 2005. Seasonal thyroidal activity and reproductive characteristics of Iranian fat-tailed rams. Animal Reproduction Science, 88, 3-4: 245-255.

Статията е приета на 12.12.2012 г.  
Рецензент – проф. д-р Васил Николов  
E-mail: vsn3480@abv.bg