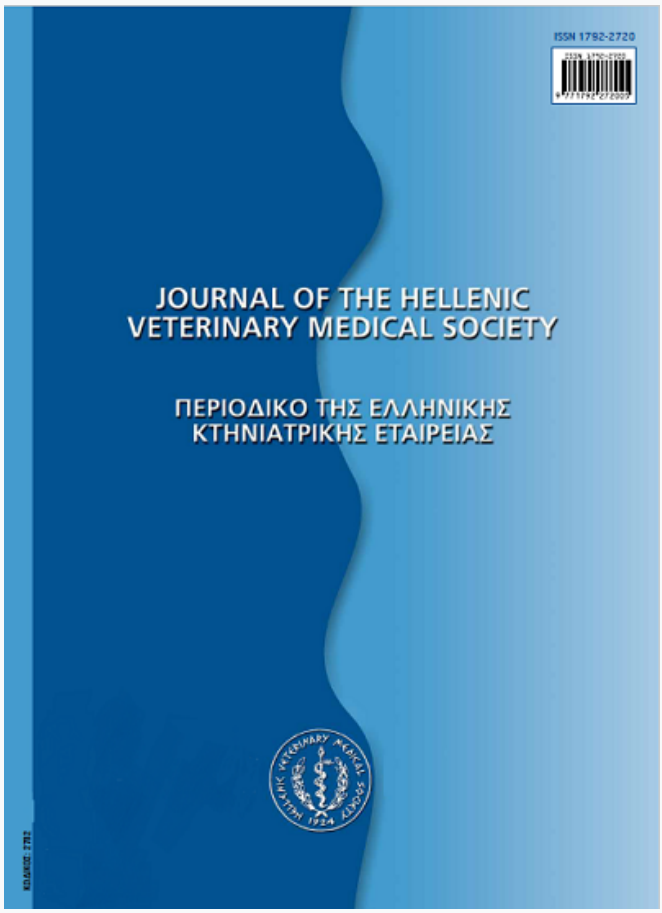
ePublishing

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 57, No 3 (2006)




# An endeavor to improve longevity of cryopreserved equine sperm

*TAA KCHALIFA, M. M. WAHEED, A. G. LYMBEROPOULOS (Α.Γ. ΛΥΜΠΕΡΟΠΟΥΛΟΣ)*

doi: 10.12681/jhvms.15039

**To cite this article:**

KCHALIFA, T., WAHEED, M. M., & LYMBEROPOULOS (Α.Γ. ΛΥΜΠΕΡΟΠΟΥΛΟΣ) A. G. (2017). An endeavor to improve longevity of cryopreserved equine sperm. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *57*(3), 195–204. https://doi.org/10.12681/jhvms.15039

https://epublishing.ekt.gr | **e-Publisher:** EKT | **Downloaded at:** 12/02/2026 20:44:31

ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 2006, 57(3): 195-204
JOURNAL OF THE HELLENIC VETERINARY MEDICAL SOCIETY 2006, 57(3): 195-204

Ερευνητική
Original article

# Βελτίωση της μακροβιότητας του κατεψυγμένου σπέρματος του επιβήτορα

Khalifa T.A.A.[1], Waheed M.M.[2],
Α.Γ. Λυμπερόπουλος[1]

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Η οξειδωτική καταπόνηση των σπερματοζωαρίων κατά τη διάρκεια της συντήρησης του σπέρματος σε χαμηλές θερμοκρασίες έχει αποδειχθεί ότι είναι υπεύθυνη, σε ένα ποσοστό, για τη μείωση της κινητικότητας και της γονιμοποιητικής τους ικανότητας. Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό την εκτίμηση της in-vitro επίδρασης των αντιοξειδωτικών, της καφεΐνης ή του συνδυασμού τους στη μακροβιότητα του κατεψυγμένου σπέρματος του επιβήτορα. Ίσα μέρη κλάσματος εκσπερματίσματος απαλλαγμένου από τη ζελατινώδη φάση (n=12), τα οποία συλλέχθηκαν από 5 ίππους Αραβικής φυλής (9-18 ετών), μη γνωστής αντοχής των σπερματοζωαρίων στην κατάψυξη, αναμείχθηκαν σε αναλογία 1:1 με αραιωτικό Tris-κρόκου αυγού. Έγινε φυγοκέντρηση σε 500 x g για 5 min, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο υγρό και στο ίζημα των σπερματοζωαρίων γινόταν προσθήκη σε 2 φάσεις αραιωτικού, το οποίο περιείχε ή δεν περιείχε αντιοξειδωτικά (0.50 mg/ml πυρουβικό νάτριο, 1 mg/ml θειοθειϊκό νάτριο, 5 mg/ml αλβουμίνη βόειου ορού, 0.15 mg/ml χλωριούχο ψευδάργυρο και 0.50mg/ml 3-υδροξυ-4-μεθοξυ-κυναμικό οξύ). Στη συνέχεια, το αραιωμένο σπέρμα καταψύχθηκε με τη μορφή συμπυκνωμένων σφαιριδίων των 0.25 ml. Πριν την κατάψυξη, η τελική συγκέντρωση της γλυκερίνης, καθώς και ο αριθμός των σπερματοζωαρίων ήταν 5% και 562-924x$10^6$/ml, αντιστοίχως. Τα κατεψυγμένα σφαιρίδια αραιωμένου σπέρματος, με ή χωρίς αντιοξειδωτικά, αποψύχθηκαν σε διάλυμα Tris-κιτρικό οξύ-γλυκόζη (40°C για 30 sec), το οποίο περιείχε 0, 0.49, 0.97 ή 1.94mg καφεΐνης/ml και επωάσθηκαν (140-230x$10^6$ σπερματοζωάρια/ml) σε θερμοκρασία 30°C για 3 h. Η κινητικότητα των προοδευτικά κινούμενων σπερματοζωαρίων (%) εκτιμήθηκε μετά τη φυγοκέντρηση, πριν την κατάψυξη και 0, 1, 2 και 3 h μετά την απόψυξη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπήρχε σημαντική επίδραση ($P<0.05$) των χειρισμών στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων μόνο μετά την απόψυξη. Η προσθήκη μόνο αντιοξειδωτικών ή μόνο καφεΐνης δεν βελτίωσε σημαντικά τη διατήρηση της κινητικότητας του σπέρματος. Αντίθετα, η προσθήκη των αντιοξειδωτικών, σε συνδυασμό με 0.97 ή 1.94 mg καφεΐνης/ml, αποτέλεσαν τον καλύτερο συνδυασμό για τη σημαντική βελτίωση της μακροβιότητας των σπερματοζωαρίων του επιβήτορα.

**Λέξεις ευρετηρίασης:** επιβήτορας, σπέρμα, αντιοξειδωτικά, καφεΐνη

[1] ΕΘΙΑΓΕ-Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης, 570 08 Ιωνία, Θεσσαλονίκη.
[2] Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, Giza 12515, Egypt.

*Ημερομηνία υποβολής: 22.05.2006*
*Ημερομηνία εγκρίσεως: 09.11.2006*

# An endeavor to improve longevity of cryopreserved equine sperm

Khalifa T.A.A.[1], Waheed M.M.[2],
Lymberopoulos A.G.[1]

**ABSTRACT.** Exposure of sperm cells to the oxidative stress pending hypothermic storage of semen has been suggested to be responsible, in part, for the decline of their motility and fertility. This study was conducted to evaluate the in-vitro effects of antioxidants (AOs) and / or caffeine on longevity of cryopreserved stallion spermatozoa. Aliquots from the gel-free fraction of semen ejaculates (n=12), collected from 5 Arabian stallions (9-18 years old) of unknown sperm freezability, were mixed 1:1 with a Tris-egg yolk extender (TEYE), centrifuged at 500 x g for 5 min and sperm cells were frozen in the form of 0.25-ml concentrated pellets after 2-step addition of TEYE supplemented with or without AOs (0.50 mg / ml Na pyruvate, 1 mg / ml Na thiosulfate, 5 mg / ml bovine serum albumin, 0.15 mg / ml zinc chloride and 0.50 mg / ml ferulic acid). The final pre-freeze concentrations of glycerol and sperm cells were 5% and 562-924 x $10^6$ / ml, respectively. Frozen pellets from non-AOs and AOs-treated sperm were thawed in a Tris-citric acid-glucose solution (40°C) containing 0, 0.49, 0.97 or 1.94 mg / ml caffeine and incubated (140-230 x $10^6$ sperm / ml) at 30°C for 3 h. Sperm progressive motility (%) was assessed after centrifugation, before freezing and after 0, 1, 2 and 3 h of thawing. The results revealed significant ($P<0.05$) effects of sperm treatments only on post-thaw motility. Neither AOs alone nor caffeine alone could significantly ameliorate the maintenance of sperm motility. AOs plus 0.97 or 1.94 mg / ml caffeine were the superior supplements in improving the longevity of stallion spermatozoa.

**Key words:** stallion, semen, antioxidants, caffeine

[1] National Agricultural Research Foundation -Veterinary Research Institute, GR-570 08 Ionia, Thessaloniki, Greece.
[2] Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, Giza 12515, Egypt.

*Submission date: 22.05.2006*
*Approval date: 09.11.2006*

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα σπερματοζωάρια του επιβήτορα είναι πολύ ευαίσθητα στην οξειδωτική καταπόνηση λόγω της απόλυτης εξάρτησής τους από τον αερόβιο μεταβολισμό προκειμένου να καλύψουν τις ανάγκες τους σε αδενοσινοτριφωσφορικό οξύ (ATP) (Engle και συν. 1975), λόγω αδυναμίας τους να επιδιορθώσουν τις κυτταρικές μεμβράνες ή να συνθέσουν αντιοξειδωτικά (AOs) (Mann and Lutwak-Mann, 1981) και της αφθονίας των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που υπάρχουν στο περιεχόμενό τους (Parks and Lynch, 1992). Επίσης, διαθέτουν την ικανότητα να παράγουν υπεροξείδια ($O_2^-$) και υπεροξείδια του υδρογόνου ($H_2O_2$) διαμέσου της μιτοχονδριακής αναπνοής ή να εφοδιάζουν με δραστηριότητα το σύστημα οξείδωσης της NADPH (Ball and Vo, 1999; Aitken and Baker, 2004) και έχουν περιορισμένο ενδογενή αντιοξειδωτικό μηχανισμό άμυνας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα σπερματοζωάρια, στα τελευταία στάδια της σπερματογένεσης, να απορρίπτουν το μεγαλύτερο μέρος του κυτταροπλάσματος, με αποτέλεσμα να χάνουν και το μεγαλύτερο μέρος των ενζύμων που παίζουν ρόλο στην άμυνα τους και τα οποία προστατεύουν τα σωματικά κύτταρα από τη βλάβη της υπεροξείδωσης (Hughes και συν. 1998; Ball και συν. 2000).

Το κατεψυγμένο σπέρμα του επιβήτορα, όταν αποψυχθεί, έχει μικρότερη διάρκεια ζωής και χαμηλότερη γονιμοποιητική ικανότητα σε σύγκριση με το νωπό (Samper, 2001). Αυτό έχει αποδειχθεί ότι οφείλεται μερικώς στις ανισότητες που υπάρχουν μεταξύ νωπού και κατεψυγμένου σπέρματος σε ότι αφορά στην ταχύτητα σχηματισμού των ανιόντων των υπεροξειδίων ($O_2^-$) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου ($H_2O_2$) (Ball and Vo, 1999) ή στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση των ελεύθερων ιόντων ασβεστίου ($Ca^{2+}$) (Samper, 2001; Pommer και συν. 2002).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας βελτίωσης της αντοχής των σπερματοζωαρίων του επιβήτορα στην κατάψυξη με την προσθήκη αντιοξειδωτικών σε αραιωτικά που περιέχουν Tris-κρόκο αυγού πριν την κατάψυξη και/ή προσθήκη καφεΐνης μετά την απόψυξη.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Όλες οι χημικές ουσίες που ήταν απαραίτητες για την παρασκευή των αραιωτικών παρουσιάζονται στον πίνακα 1 και η προμήθειά τους έγινε από την Sigma-Aldrich Co., Deisenhofen, Γερμανία. Μίγμα πυροβικού νατρίου (0.50 mg/ml), θειοθειϊκού νατρίου (1mg/ml), BSA (5 mg/ml), χλωριούχου ψευδαργύρου (0.15 mg/ml) και 3-υδροξυ-4-μεθοξυ-κυναμικού οξέος (0.50 mg/ml) χρησιμοποιήθηκε, μετά από προκαταρ-

## INTRODUCTION

Stallion spermatozoa are endowed with an extreme liability to the oxidative stress in view of their absolute reliance on the aerobic metabolism to meet their ATP requirements (Engle et al, 1975), their inability to repair membranes or to synthesize AOs (Mann and Lutwak-Mann, 1981), their exuberant content of polyunsaturated fatty acids (PUFA) (Parks and Lynch, 1992), their unique capacity to generate $O^{2-}$ and $H_2O_2$ through mitochondrial respiration or fueling the activity of NADPH oxidase system (Ball and Vo, 1999; Aitken and Baker, 2004) and their restricted endogenous antioxidant defense mechanism, viz., as spermatozoa discard the majority of their cytoplasm during final stages of spermatogenesis, they lose most of the cytoplasmic defense enzymes which safeguard somatic cells from the peroxidative damage (Hughes et al., 1998; Ball et al., 2000).

Cryoconserved stallion sperm experience a shorter lifetime and a lower fertility than their fresh coordinates (Samper, 2001). This was partially accredited to the outstanding imparities between fresh and frozen sperm in the generation rate of superoxide anions ($O^{2-}$) and hydrogen peroxide ($H_2O_2$) (Ball and Vo, 1999) or in the intracellular concentration of free calcium ions ($Ca^{2+}$) (Samper, 2001; Pommer et al., 2002).

The objective of the present study was, therefore, to investigate if pre-freeze inclusion of antioxidants (AOs) in Tris-egg yolk extenders and/or post-thaw supplementation of sperm cells with caffeine could ameliorate freezability of stallion semen.

## MATERIALS AND METHODS

All chemicals utilized in preparation of media presented in table 1 were purchased from Sigma-Aldrich Co., Deisenhofen, Germany. A mixture of sodium pyruvate (0.50 mg/ml), sodium thiosulfate (1 mg/ml), BSA (5 mg/ml), zinc chloride (0.15 mg/ml) and ferulic acid (0.50 mg/ml) were used in conformity with a preliminary dose-response study that was conducted on 28 water- and lipid-soluble AOs for selection of the optimal combination of them in Tris-egg yolk extenders based on motility, viability, plasma membrane integrity and morphological normalcy of stored (5°C for 96 h) stallion spermatozoa.

On the basis of once biweekly collection schedule (from May to August 2003), semen samples were obtained via a CSU-style artificial vagina from 5 Arabian stallions (9, 10, 13, 15 and 18 years old) of unknown sperm freezability and belonging to El-Zahra Arab Horse Stud, Cairo, Egypt. At the time of collection (early in the morning before offering the daily ration),

**Πίνακας 1.** Σύνθεση και θερμοκρασία των αραιωτικών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη φυγοκέντρηση του σπέρματος και τη διαδικασία της κατάψυξης/απόψυξης του σπέρματος του επιβήτορα σε μορφή συμπυκνωμένων σφαιριδίων των 0.25 ml.

| Συστατικά | Αραιωτικά | | | | Διάλυμα απόψυξης 40°C |
|---|---|---|---|---|---|
| | Α Χωρίς αντιοξειδωτικά 30°C | Β Με αντιοξειδωτικά 30°C | Γ Χωρίς αντιοξειδωτικά 5°C | Δ Με αντιοξειδωτικά 5°C | |
| Tris (υδροξυμεθυλ-) αμινομεθάνιο* (g) | 2.40 | 2.40 | 2.40 | 2.40 | 2.40 |
| Άνυδρο κιτρικό οξύ* (g) | 1.25 | 1.25 | 1.25 | 1.25 | 1.25 |
| Ένυδρη D-Γλυκόζη* με ένα μόριο $H_2O$(g) | 0.45 | 0.45 | 0.45 | 0.45 | 0.45 |
| Νατριούχος πενικιλίνη G* (IU) | 50.000 | 50.000 | 50.000 | 50.000 | 50.000 |
| Θειϊκή στρεπτομυκίνη* (mg) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Φρέσκος κρόκος αυγού* (ml) | 22 | 22 | 22 | 22 | - |
| Πυρουβικό νάτριο (mg) | - | 50 | - | 50 | - |
| Θειοθειϊκό Νάτριο, $5H_2O$ (mg) | - | 100 | - | 100 | - |
| Αλβουμίνη βόειου ορού, «ελεύθερη» λιπαρών οξέων (mg) | - | 500 | - | 500 | - |
| Χλωριούχος ψευδάργυρος (mg) | - | 15 | - | 15 | - |
| 3-υδροξυ-3-μεθοξυκυναμικό οξύ (mg) | - | 50 | - | 50 | - |
| Γλυκερίνη (ml) | - | - | 10 | 10 | - |
| Απεσταγμένο νερό υάλινης στήλης* (ml) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

* Τα βασικά συστατικά του αραιωτικού με βάση το Tris (Samper and Crabo, 1993).
Ίσα κλάσματα των αραιωτικών που παρασκευάστηκαν και τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια των 50 ml σε θερμοκρασία -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

**Table 1.** Composition and temperature of media used in centrifugation of semen, two-step addition of extenders and freeze/thaw processing of stallion sperm in the form of 0.25-ml pellets

| Components | Extenders | | | | Thawing solution 40°C |
|---|---|---|---|---|---|
| | A Control 30°C | B Antioxidants 30°C | Γ Control 5°C | Δ Antioxidants 5°C | |
| Tris (hydroxymethyl) amino methane* (g) | 2.40 | 2.40 | 2.40 | 2.40 | 2.40 |
| Citric acid anhydrous* (g) | 1.25 | 1.25 | 1.25 | 1.25 | 1.25 |
| D-Glucose monohydrate* (g) | 0.45 | 0.45 | 0.45 | 0.45 | 0.45 |
| Penicillin G sodium* (IU) | 50.000 | 50.000 | 50.000 | 50.000 | 50.000 |
| Streptomycin sulfate* (mg) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Fresh chicken egg yolk* (ml) | 22 | 22 | 22 | 22 | - |
| Sodium pyruvate (mg) | - | 50 | - | 50 | - |
| Sodium thiosulfate, $5H_2O$ (mg) | - | 100 | - | 100 | - |
| Bovine serum albumin (BSA) Fraction V, Fatty acid-free (mg) | - | 500 | - | 500 | - |
| Zinc chloride (mg) | - | 15 | - | 15 | - |
| Ferulic acid (3-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid) (mg) | - | 50 | - | 50 | - |
| Glycerol (ml) | - | - | 10 | 10 | - |
| Glass-distilled water* (ml) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

* The basic ingredients of Tris extender (Samper and Crabo, 1993).
Single batches of these media were formulated and reposited in 50-ml vials at -20°C until used.

κτική μελέτη της χορηγούμενης δόσης και της ανταπόκρισης των σπερματοζωαρίων σε 28 υδατο- και λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά (AOs), για την επιλογή του άριστου συνδυασμού αυτών σε αραιωτικά που περιείχαν Tris και κρόκο αυγού. Η αξιολόγηση έγινε με βάση τη ζωτικότητα, την κινητικότητα, την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης και τις μορφολογικές ανω-

an estrous mare was used as a mount animal. Prewarmed collection bottles fitted with nylon filters were used for seclusion of gel from semen. Each animal was housed in a hygienic separate stall and fed 2 to 4 Kg of a balanced grain ration plus 5 to 7 Kg of barseem hay daily. All stallions had sired foals and their overall per-cycle pregnancy rates pending the preceding natural

μαλίες των σπερματοζωαρίων του επιβήτορα που διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 5°C για 96 h.

Με βάση το πρωτόκολλο σπερματοσυλλογής της εκτροφής, η συλλογή του σπέρματος γινόταν μία φορά κάθε 2 εβδομάδες (από Μάιο μέχρι Αύγουστο 2003). Στο διάστημα αυτό συλλέχθηκαν τυχαία 2-3 εκσπερματίσματα με τεχνητό κόλπο τύπου CSU από 5 επιβήτορες Αραβικής φυλής (9, 10, 13, 15, 18 ετών) μη γνωστής αντοχής στην κατάψυξη και οι οποίοι ανήκαν στο ιπποφορβείο του El-Zahra του Καΐρου της Αιγύπτου. Για τη συλλογή του σπέρματος (νωρίς το πρωί πριν τη χορήγηση της καθημερινής τροφής) χρησιμοποιήθηκε φοράδα που βρισκόταν σε οίστρο. Τα φιαλίδια συλλογής σπέρματος είχαν προθερμανθεί και στο στόμιο τους είχαν προσαρμοστεί νάϋλον φίλτρα για το διαχωρισμό της ζελατινώδους φάσης από το σπέρμα. Τα ζώα σταβλίζονταν σε ατομικά κελιά που πληρούσαν όλα τα μέτρα υγιεινής και τους χορηγούνταν 2-4 κιλά ισορροπημένου σιτηρεσίου αποτελούμενου από δημητριακούς καρπούς και 5-7 κιλά την ημέρα σανός μηδικής. Όλοι οι επιβήτορες είχαν απογόνους και τα ποσοστά σύλληψης ανά κύκλο κατά τη διάρκεια του προγράμματος της προηγούμενης περιόδου φυσικών οχειών ήταν 66.67% (10/15), 53.33% (8/15), 64.52% (20/31), 55.00% (11/20) και 62.50% (25/40).

Μετά τη συλλογή του σπέρματος, το απαλλαγμένο από τη ζελατινώδη φάση κλάσμα του εκσπερματίσματος εξεταζόταν και αραιώνονταν μόνο τα δείγματα εκείνα (n=2-3 / επιβήτορα) που είχαν ζωτικότητα μεγαλύτερη από 50% και πυκνότητα 250x10$^6$ σπερματοζωαρία/ml. Δυο ίσα κλάσματα από το απαλλαγμένο της ζελατινώδους φάσης εκσπερμάτισμα μεταφέρονταν σε κωνικά φιαλίδια φυγοκέντρησης των 14 ml. Το πρώτο κλάσμα (6 ml, μάρτυρας) αραιωνόταν με 6 ml από το αραιωτικό **Α,** ακολουθούσε φυγοκέντρηση (500 x g για 5 min) σε θερμοκρασία δωματίου, απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και το ίζημα των σπερματοζωαρίων επαναφερόταν με 1.50 ml του αραιωτικού **Α.** Με τον ίδιο τρόπο γινόταν η αραίωση του δεύτερου μέρους (6 ml, AOs), με τη μόνη διαφορά ότι το ίζημα των σπερματοζωαρίων επαναφερόταν με 1.50 ml του αραιωτικού **Β.** Τα δύο κλάσματα τοποθετούνταν σε ψυκτικό θάλαμο σε θερμοκρασία 5°C για χρονική διάρκεια 4 h. Ο βαθμός ψύξης ήταν ταχύς από τους 30 στους 19°C (-0.70°C/min), βραδύς από τους 19 στους 8°C (-0.05°C/min) και ξανά ταχύς από τους 8 στους 5°C (-0.70°C/min). Ακολουθούσε γλυκερίνωση με την προσθήκη 1.50 ml από το αραιωτικό **Γ** στο πρώτο μέρος και 1.50 ml από το αραιωτικό **Δ** στο δεύτερο κλάσμα, και στη συνέχεια εξισορρόπηση στους 5°C για διάστημα 3-4 h. Οι τελικές συγκεντρώσεις της γλυκερίνης και ο αριθμός των σπερματοζωαρίων στα δυο

service program were 66.67% (10/15), 53.33% (8/15), 64.52% (20/31), 55.00% (11/20) and 62.50% (25/40).

After collection, the gel-free fraction of the ejaculate was evaluated and only samples (n=2 to 3/stallion) with more than 50% initial motility and 250 x 10$^6$ sperm cells/ml were processed. Two aliquots of gel-free semen from each ejaculate were transferred to 14-ml conical centrifuge tubes. The first aliquot (6 ml, control) was diluted with 6 ml of extender **A,** centrifuged (500 x g for 5 min) at room temperature, the supernatant was aspirated and sperm pellet was reconstituted in 1.50 ml of extender **A.** The second aliquot (6 ml, AOs) was treated as described above, but sperm pellet was resuspended in 1.50 ml of extender **B.** Both aliquots were then cooled to 5°C over a 4-h period. The cooling rates were rapid from 30 to 19°C (-0.70°C/min), slow from 19 to 8°C (-0.05°C/min) and again rapid from 8 to 5°C (-0.70°C/min). Cooled spermatozoa were glycerinated by adding 1.50 ml of extender **C** to the first aliquot and 1.50 ml of extender **D** to the second aliquot, and then equilibrated at 5°C for 3-4 h. The final concentrations of glycerol and spermatozoa in equilibrated aliquots were 5% and 562-924 x 10$^6$/ml, respectively. Next, spermatozoa were frozen in the form of 0.25-ml pellets onto a plate made of polytetrafluoroethylene that was cooled beforehand by immersing it in liquid nitrogen for 10 min and raising it up to be exposed to the vapor of liquid nitrogen. After 3 min, frozen pellets were plunged in liquid nitrogen for 10 min and promptly thawed by dropping one pellet into a test tube containing 0.75 ml of a pre-warmed (40°C) thawing solution (table 1), which was supplemented with 0, 0.49, 0.97 or 1.94 mg/ml caffeine. Afterwards, frozen-thawed spermatozoa (140-230 x 10$^6$/ml) were incubated at 30°C for 3 h. Two pellets were used for each post-thaw sperm treatment.

Sperm progressive motility was examined in gel-free semen, after centrifugation and resuspension of sperm in glycerol-free extenders, just before freezing and after thawing as well as at hourly intervals of post-thaw incubation period. All estimations of motility percentages were carried out by a single observer using a phase-contrast microscope (400 x), equipped with a thermal stage maintained at 37°C. The viability index of frozen-thawed spermatozoa was computed from the following equation (Milovanov et al., 1964) :

$$VI = \sum \left[ M \times \frac{T - R}{2} \right]$$

where VI is the viability index, Σ is a sign for the sum total, M is the percentage of sperm motility, T is the time of next determination of motility and R is the time of previous determination of motility. The concen-

ίσα κλάσματα του σπέρματος που είχαν υποστεί την εξισορρόπηση ήταν 5% και 562-924x10$^6$ σπερματοζωάρια/ml, αντιστοίχως. Στη συνέχεια, τα σπερματοζωάρια καταψύχονταν με τη μορφή συμπυκνωμένων σφαιριδίων των 0.25 ml σε πλάκα κατασκευασμένη από πολυτετραφλουοροεθυλένιο, η οποία πρώτα εμβαπτιζόταν σε υγρό άζωτο για 10 min και στη συνέχεια ανυψωνόταν και εκτίθετο στους ατμούς του υγρού αζώτου. Μετά από 3 min τα κατεψυγμένα σφαιρίδια καταδύονταν στο υγρό άζωτο για 10 min. Η απόψυξη των σφαιριδίων γινόταν με τη μεταφορά του συμπυκνωμένου σφαιριδίου σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 0,75 ml διαλύματος απόψυξης (πίνακας 1), το οποίο προηγουμένως είχε προθερμανθεί (40°C) και στο οποίο είχαν προστεθεί διαφορετικές συγκεντρώσεις καφεΐνης 0, 0.49, 0.97 ή 1.94 mg/ml. Κατόπιν, τα σπερματοζωάρια (140-230x10$^6$ σπερματοζωάρια/ml) επωάζονταν σε θερμοκρασία 30°C για διάστημα 3 h. Για τον έλεγχο της γονιμοποιητικής ικανότητας του κατεψυγμένου σπέρματος χρησιμοποιούνταν δυο σφαιρίδια για κάθε μεταχείριση του σπέρματος.

Η κινητικότητα των προοδευτικά κινούμενων σπερματοζωαρίων ελεγχόταν στο απαλλαγμένο από τη ζελατινώδη φάση σπέρμα μετά τη φυγοκέντρηση και την επαναφορά των σπερματοζωαρίων με τα απαλλαγμένα γλυκερίνης αραιωτικά, πριν την κατάψυξη και μετά την απόψυξη, καθώς και κάθε 1 ώρα κατά τη διάρκεια της επώασης. Οι εκτιμήσεις της ζωτικότητας γίνονταν πάντα από το ίδιο άτομο με τη χρήση μικροσκοπίου αντιθέτου φάσης (x400), εφοδιασμένου με θερμαινόμενη πλάκα στη θερμοκρασία των 37°C. Ο δείκτης της ζωτικότητας των κατεψυγμένων-αποψυχθέντων σπερματοζωαρίων υπολογιζόταν από την παρακάτω εξίσωση (Milovanov και συν. 1964):

$$VI = \sum \left[ M \times \frac{T - R}{2} \right]$$

όπου VI είναι ο δείκτης ζωτικότητας, Σ είναι το συνολικό άθροισμα, M είναι η ποσοστιαία αναλογία της ζωτικότητας των σπερματοζωαρίων, T είναι ο χρόνος της επόμενης εκτίμησης της ζωτικότητας και R είναι ο χρόνος της προηγούμενης εκτίμησης της ζωτικότητας. Η καταμέτρηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων στο απαλλαγμένο από τη ζελατινώδη φάση σπέρμα, στα εξισορροπημένα ίσα κλάσματα του σπέρματος και στα αποψυχθέντα σφαιρίδια γινόταν με τη βοήθεια αιματοκυτταρο-μέτρου Neubauer.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε σύμφωνα με τους Snedecor and Cochran (1980). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα. Οι διαφορές μεταξύ της ποσοστιαίας αναλογίας της ζωτικότητας των σπερματοζωαρίων που πε-

tration of sperm cells in gel-free semen, equilibrated aliquots and in thawed pellets was measured by a Neubauer haemocytometer.

Statistical analysis of the results was performed according to Snedecor and Cochran (1980). Results are presented as means ± SEM. Differences between motility percentages of untreated and AOs-treated sperm (post-centrifugation and pre-freeze) were determined by an unpaired two-tailed t-test. Analysis of variance (two-way ANOVA) and the least significant difference (LSD) test were used to examine the effects of semen treatments and incubation time on post-thaw motility percentages. One-way ANOVA and LSD test were applied in order to analyze the influence of sperm treatments on post-thaw viability indices. All P-values less than 0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

The overall means of gel-free fraction volume, sperm motility percentage and sperm concentration of semen ejaculates were 28.35±3.25 ml, 77.50±3.27 % and 358.08±32.91 x 10$^6$/ml, respectively.

Apart from sperm treatments, the motility percentages after centrifugation, before freezing, after 0, 1, 2 and 3 h of thawing averaged 84.38 ± 2.28, 81.88 ± 2.49, 50.00±1.18, 38.75±1.41, 22.73±1.55 and 14.14±1.20 %, respectively. Incubation time had a significant ($P < 0.0005$) effect on post-thaw sperm motility percentages.

Post-centrifugation (84.38±3.20 and 85.38±3.46 %) and pre-freeze (80.00±3.41 and 83.75±3.75 %) motility did not differ ($P > 0.05$) among untreated and AOs-treated sperm, respectively. Nonetheless, immediately after thawing (table 2), the motility percentages of sperm, treated with 1.94 mg /ml caffeine alone or with AOs plus increasing concentrations of caffeine, were significantly ($P < 0.05$) higher than those of untreated sperm. Meanwhile, upon incubation of semen for 1 or 2 h, the amelioration in motility percentages remained ($P < 0.05$) solely for sperm, supplemented with AOs plus 0.97 or 1.94 mg / ml caffeine. At 3 h of incubation, motility percentages of sperm, treated with AOs plus 1.94 mg/ml caffeine, tended ($P > 0.05$) to be higher than that of other sperm treatments. The interaction between incubation time and semen treatments was significant ($P < 0.05$).

Values of post-thaw viability indices were not significantly improved by addition of AOs alone or caffeine alone at any concentration. However, the viability indices of sperm exposed to AOs plus caffeine at 0.97 mg/ml (119.06±7.68) or 1.94 mg/ml (120.63±8.73) were superior ($P<0.05$) to those of untreated sperm (79.38± 7.82) and sperm treated with 0.49 mg/ml caffeine alone

**Πίνακας 2.** Η επίδραση των αντιοξειδωτικών και/ή της καφεΐνης στην κινητικότητα (%) κατά την κατάψυξη-απόψυξη του σπέρματος του επιβήτορα.

| Μεταχείριση σπέρματος | Καφεΐνη (mg/ml) | Διάρκεια επώασης μετά την απόψυξη | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 0h | 1h | 2h | 3h |
| Χωρίς αντιοξειδωτικά | 0,00 | 41.25±2.27[a] | 31.88±4.53[a] | 16.25±3.50[a] | 10.63±3.20[a] |
| | 0,49 | 46.88±3.53[ab] | 34.38±4.95[ab] | 17.50±3.54[ab] | 12.50±3.78[a] |
| | 0,97 | 47.50±4.63[ab] | 36.88±5.08[ab] | 18.75±4.30[ab] | 12.50±3.27[a] |
| | 1,94 | 53.13±2.82[b] | 40.00±3.66[ab] | 20.00±6.05[abc] | 11.88±3.89[a] |
| Με αντιοξειδωτικά | 0,00 | 49.38±3.20[ab] | 36.88±3.53[ab] | 22.50±3.78[ab] | 15.63±3.33[a] |
| | 0,49 | 51.25±3.50[b] | 41.25±3.24[ab] | 24.38±4.06[abc] | 16.88±4.32[a] |
| | 0,97 | 55.63±2.20b | 43.75±2.95b | 32.50±2.67[c] | 15.00±3.41[a] |
| | 1,94 | 55.00±2.31[b] | 45.00±2.83[b] | 30.00±4.91[bc] | 18.13±2.66[a] |

[a,b,c] Οι μέσες τιμές σε κάθε στήλη με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά ($P < 0.05$).

**Table 2.** Effect of antioxidants and/or caffeine on motility (%) of frozen-thawed stallion sperm.

| Semen treatments | Caffeine (mg/ml) | Post-thaw incubation time | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 0h | 1h | 2h | 3h |
| Control | 0,00 | 41.25±2.27[a] | 31.88±4.53[a] | 16.25±3.50[a] | 10.63±3.20[a] |
| | 0,49 | 46.88±3.53[ab] | 34.38±4.95[ab] | 17.50±3.54[ab] | 12.50±3.78[a] |
| | 0,97 | 47.50±4.63[ab] | 36.88±5.08[ab] | 18.75±4.30[ab] | 12.50±3.27[a] |
| | 1,94 | 53.13±2.82[b] | 40.00±3.66[ab] | 20.00±6.05[abc] | 11.88±3.89[a] |
| Antioxidants | 0,00 | 49.38±3.20[ab] | 36.88±3.53[ab] | 22.50±3.78[ab] | 15.63±3.33[a] |
| | 0,49 | 51.25±3.50[b] | 41.25±3.24[ab] | 24.38±4.06[abc] | 16.88±4.32[a] |
| | 0,97 | 55.63±2.20b | 43.75±2.95b | 32.50±2.67[c] | 15.00±3.41[a] |
| | 1,94 | 55.00±2.31[b] | 45.00±2.83[b] | 30.00±4.91[bc] | 18.13±2.66[a] |

[a,b,c] Means ± SEM within columns having dissimilar superscripts are significantly different at $P < 0.05$ (n=12).

ριείχαν αντιοξειδωτικά και εκείνων που δεν περιείχαν (μετά τη φυγοκέντρηση και πριν την κατάψυξη) προσδιορίστηκαν με το t-test (unpaired two-tailed). Η ανάλυση διακύμανσης (two-way ANOVA) και η δοκιμή της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς (LSD) χρησιμοποιήθηκαν για την εξέταση της επίδρασης των χειρισμών του σπέρματος και του χρόνου της επώασης στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων μετά την απόψυξη. Η ανάλυση διακύμανσης (one-way ANOVA) και η δοκιμή της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς (LSD) εφαρμόστηκαν για την ανάλυση της επίδρασης των χειρισμών του σπέρματος στη ζωτικότητά του μετά την απόψυξη. Οι έλεγχοι έγιναν για επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι μέσοι όροι του όγκου, της ποσοστιαίας αναλογίας της ζωτικότητας και της πυκνότητας του απαλλαγμένου από τη ζελατινώδη φάση κλάσματος του σπέρματος ήταν 28.35±3.25ml, 77.50±3.27% και 358.08±32.91x$10^6$ σπερματοζωαρίων/ml, αντιστοίχως.

(87.81±10.92), but were not significantly different from those of sperm supplemented with AOs alone (99.69±8.86) or with caffeine alone at 0.97 mg/ml (91.88±11.79) and 1.94 mg/ml (98.44±12.35).

## DISCUSSION

Many factors may impose an extra oxidative load on cryopreserved sperm cells, such as **1)** the dilution rates and availability of oxygen during semen processing (Shannon, 1965); **2)** the presence of significant populations of dead and damaged spermatozoa (Vishwanath and Shannon, 1997; Ball and Vo, 1999), as well as immature germ cells and leukocytes (Baumber et al., 2002; Khalifa et al., 2003) in semen; **3)** centrifugation and removal most of seminal plasma (Ball et al., 2000; Hegab and Khalifa, 2003); **4)** excessive influx of $Ca^{2+}$ into spermatozoa, particularly in milk-based extenders (ME), which is accompanied by intracellular production of $H_2O_2$ and premature capacitation (Pommer et al., 2002; Aitken and Baker, 2004); and **5)** the reduction of antioxidant defenses observed in sperm cells after cryopreser-

Πέρα από τους χειρισμούς του σπέρματος, η ποσοστιαία αναλογία των προοδευτικά κινούμενων σπερματοζωαρίων, μετά τη φυγοκέντρηση, πριν την κατάψυξη και 0, 1, 2 και 3 h μετά την απόψυξη, ήταν κατά μέσο όρο 84.38±2.28, 81.88±2.49, 50.00±1.18, 38.75±1.41, 22.73±1.55 και 14.14±1.20%, αντιστοίχως. Η χρονική διάρκεια της επώασης είχε σημαντική επίδραση (P<0.0005) στην ποσοστιαία αναλογία των προοδευτικά κινούμενων σπερματοζωαρίων μετά την απόψυξη.

Μετά τη φυγοκέντρηση (84.38±3.20 και 85.38±3.46%) και πριν την κατάψυξη (80.00±3.41 και 83.75±3.75%) δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά (P>0.05) στην ποσοστιαία αναλογία των προοδευτικά κινούμενων σπερματοζωαρίων στα δείγματα που περιείχαν αντιοξειδωτικά σε σύγκριση με τα δείγματα που δεν περιείχαν. Παρ' όλα αυτά, αμέσως μετά την απόψυξη (πίνακας 2), η ποσοστιαία αναλογία των προοδευτικά κινούμενων σπερματοζωαρίων, στα δείγματα που περιείχαν μόνο 1.94 mg καφεΐνης/ml ή αντιοξειδωτικά με αυξημένες συγκεντρώσεις καφεΐνης, ήταν σημαντικά (P<0.05) υψηλότερη σε σύγκριση με εκείνα που δεν περιείχαν καθόλου καφεΐνη ή αντιοξειδωτικά. Εν τω μεταξύ, κατά την επώαση του σπέρματος για 1 ή 2 h, παρατηρήθηκε σημαντική (P<0.05) βελτίωση της ποσοστιαίας αναλογίας της κινητικότητας μόνο στα σπερματοζωάρια στα οποία είχαν προστεθεί αντιοξειδωτικά και 0.97 ή 1.94 mg καφεΐνης/ml. Μετά δε από 3 h επώασης, η βελτίωση αυτή ήταν σημαντικά (P<0.05) υψηλότερη σε σύγκριση με τους άλλους χειρισμούς του σπέρματος. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της διάρκειας της επώασης και των χειρισμών του σπέρματος ήταν σημαντική (P<0.05).

Οι τιμές του δείκτη της ζωτικότητας μετά την απόψυξη δεν βελτιώθηκαν σημαντικά μετά την προσθήκη μόνο των αντιοξειδωτικών ή μόνο της καφεΐνης σε οποιαδήποτε συγκέντρωση. Παρ' όλα αυτά, οι δείκτες της ζωτικότητας των σπερματοζωαρίων, τα οποία εκτέθηκαν στο συνδυασμό των αντιοξειδωτικών με συγκεντρώσεις καφεΐνης 0.97 mg/ml (119.06±7.68) ή 1.94 mg/ml (120.63±8.73), ήταν στατιστικώς σημαντικοί (P<0.05) σε σύγκριση με εκείνους της ζωτικότητας των σπερματοζωαρίων που δεν εκτέθηκαν (79.38±7.82) και των σπερματοζωαρίων που τους είχε προστεθεί μόνο καφεΐνη 0.49 mg/ml (87.81±10.92), αλλά δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά με τους δείκτες ζωτικότητας των σπερματοζωαρίων στα οποία είχαν προστεθεί μόνο αντιοξειδωτικά (99.69±8.86) ή μόνο 0.97mg /ml (91.88±11.79) και 1.94mg/ml (98.44±12.35) καφεΐνης.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πολλοί είναι οι παράγοντες που μπορεί να επι-

vation of semen in egg yolk-based extenders (EYE), which not only have a very limited capacity to eliminate $H_2O_2$ (Bilodeau et al., 2002), but also contain L-aromatic amino acids and free ions of iron ($Fe^{2+}$) and copper ($Cu^{1+}$) that key up the extracellular formation of $H_2O_2$ and hydroxyl radicals ($^{\bullet}OH$) in semen (Vishwanath and Shannon, 1997).

Considering the above-mentioned vulnerability of preserved semen to an antioxidant/pro-oxidant disequilibrium, it seems that exposure of frozen-thawed stallion spermatozoa to superphysiological levels of $O^{2-}$, $H_2O_2$ and $^{\bullet}OH$ is inevitable and may lead to a peroxidative damage to plasma and inner mitochondrial membranes, a decline in ATP, cAMP and cGMP content and a subsequent decrease in sperm longevity (Vishwanath and Shannon, 1997; Zheng and Zhang, 1997; Bilodeau et al., 2002). Consequently, the outcomes of this study revealed that concentration and pellet-freezing of sperm cells in EYE containing AOs, followed by thawing, dilution and motility stimulation of sperm cells with caffeine (0.97 or 1.94 mg/ml) as a phosphodiesterase inhibitor mediating intracellular increases of cAMP levels (Mann and Lutwak-Mann, 1981), had a beneficial impact on their motility and longevity.

Pyruvate is a potent scavenger of $H_2O_2$ (Upreti et al., 1998) and its supplementation at a concentration of 5 mM ( ~ 0.55 mg/ml) to chilled-stored stallion semen in ME (Bruemmert et al., 2002) or to frozen-thawed bull semen in EYE (Bilodeau et al., 2002) resulted in a significant augmentation of sperm motility and ATP levels. Ferulic acid (1.6 mM ~ 0.31 mg/ml), an effective constituent in various medicinal herbs, has been shown to scavenge oxygen free radicals, reduce membrane lipid peroxidation, increase intracellular cGMP level and to improve the motility and viability of human spermatozoa incubated in Ham's F-10 medium for 6 h at 37°C (Zheng and Zhang, 1997).

Oxidation of thiols (SH) in sperm proteins by $O^{2-}$ and $H_2O_2$ was found to be associated with inhibition of sperm motility and fertilizing ability (Mammoto et al., 1996). Cryopreservation of bull sperm in EYE significantly reduced the intracellular level of SH (Bilodeau et al., 2000) and post-thaw treatment of frozen semen with SH containing AOs prevented $H_2O_2$-mediated loss of sperm motility (Bilodeau et al., 2001). Supporting the results of this study, in a previous study on frozen buffalo semen, supplementation of EYE with sodium thiosulfate (1mg/ml), as a source of SH to sperm cells, led to a remarkable improvement of their motility and plasma membrane stability (Khalifa, 2001).

Luxuriant entry of $Ca^{2+}$ into sperm cells was found to coincide with activation of membrane-bound phospho-

βάλλουν ένα επιπλέον οξειδωτικό φορτίο στα κατεψυγμένα σπερματοζωάρια, όπως: 1) ο βαθμός αραίωσης και η διαθεσιμότητα του οξυγόνου κατά τη διαδικασία της επεξεργασίας του σπέρματος (Shannon, 1965), 2) η παρουσία μεγάλου αριθμού σπερματοζωαρίων, τα οποία είναι νεκρά ή έχουν υποστεί βλάβη (Vishwanath and Shannon, 1997; Ball and Vo, 1999), 3) η παρουσία στο σπέρμα ανώριμων γεννητικών κυττάρων και λευκοκυττάρων (Baumber και συν. 2002; Khalifa και συν. 2003), 4) η φυγοκέντρηση και η απομάκρυνση του μεγαλύτερου μέρους του σπερματικού πλάσματος (Ball και συν. 2000; Hegab and Khalifa, 2003), 5) η υπερβολική εισροή ιόντων $Ca^{2+}$ στα σπερματοζωάρια, ιδιαίτερα με αραιωτικά που έχουν ως βάση το γάλα και η οποία έχει ως αποτέλεσμα την εσωκυτταρική παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου ($H_2O_2$) και την πρόωρη ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων (Pommer και συν. 2002; Aitken and Baker, 2004), και 6) η αναγωγή των αντιοξειδωτικών που παρατηρείται στα σπερματοζωάρια μετά την κατάψυξη του σπέρματος με αραιωτικά που έχουν ως βάση τον κρόκο του αυγού, των οποίων η δυνατότητα να περιορίσουν το $H_2O_2$ όχι μόνο είναι περιορισμένη (Bilodeau και συν. 2002), αλλά περιέχουν, επίσης, L-αρωματικά αμινοξέα και ελεύθερα ιόντα σιδήρου ($Fe^{2+}$) και χαλκού ($Cu^{1+}$), τα οποία στο σπέρμα αποτελούν το κλειδί για το σχηματισμό έξω από το κύτταρο $H_2O_2$ και ριζών υδροξυλίου ($^{\bullet}OH$) (Vishwanath and Shannon, 1997).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, που αφορούν στη συντήρηση του σπέρματος σε μια αμφίδρομη ισορροπία αντιοξειδωτικών/πρόδρομων οξειδωτικών ενώσεων, φαίνεται ότι η έκθεση των σπερματοζωαρίων του επιβήτορα μετά την απόψυξη σε υπερφυσιολογικά επίπεδα $O^{2-}$, $H_2O_2$ και $^{\bullet}OH$ είναι αναπόφευκτη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την υπεροξειδική βλάβη της κυτταρικής μεμβράνης και της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, τη μείωση στο περιεχόμενο του ATP, του κυκλικού αδενοσινομονοφωσφορικού οξέος (cAMP) και του κυκλικού γουανοσινομονοφωσφορικού οξέος (cGMP) και στη συνέχεια, τη μείωση της μακροβιότητας του σπέρματος (Vishwanath and Shannon, 1997; Zheng and Zhang, 1997; Bilodeau και συν. 2002). Από τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας προκύπτει ότι ο αριθμός των σπερματοζωαρίων, η κατάψυξή τους σε μορφή συμπυκνωμένων σφαιριδίων με αραιωτικά που έχουν ως βάση το Tris και τον κρόκο αυγού και που περιέχουν αντιοξειδωτικά, και στη συνέχεια η απόψυξη και διέγερση της ζωτικότητας των σπερματοζωαρίων με καφεΐνη (0,97 ή 1,94 mg/ml), ουσία που λειτουργεί ως αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης και μεσολαβεί για την ενδοκυτταρική αύξηση των επιπέδων του cAMP (Mann and Lutwak-Mann, 1981), είχε θετική επίδραση στην κινητικότητα και τη μακροβιότητα των

lipases (Roldan, 1998) and peroxidative damage of their membranes (Megahed and Anwar, 1997). The stabilizing influence of zinc on sperm membranes was attributed to its ability to suppress lipid peroxidation via inhibition of phospholipases and to protect SH and PUFA in biomembranes from $Fe^{2+}$-mediated oxidation (Andrews et al., 1994). In accordance with our results, addition of zinc chloride (1mM ~ 0.14 mg / ml) to EYE brought about a significant enhancement in the motility of frozen buffalo sperm (El-Sheltawi et al., 1999).

Albumin is a crucial extracellular antioxidant (Alvarez and Storey, 1983) through its propensity to bind transition metal ions ($Fe^{2+}$ and $Cu^{1+}$) in EYE and, thereby, to minimize formation of $^{\bullet}OH$ , the powerful initiator of lipid peroxidation cascade in sperm (Halliwell, 1988; Vishwanath and Shannon, 1997). Despite incubation of stallion (Pommer et al., 2002) and bull (Bilodeau et al., 2002) spermatozoa in media containing BSA and sodium pyruvate prolonged significantly their functional lifespan compared with ME and EYE, some researchers did not observe any improvement in the motility of chilled-stored stallion sperm after inclusion of BSA (3% w/v) in ME (Ball et al., 2001).

In view of the current study, it is concluded that freeze/thaw processing of stallion semen, in the presence of both AOs and 0.97 or 1.94 mg/ml caffeine, achieved a significant amelioration in the maintenance of sperm motility.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was technically supported by the Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine Cairo, University, Egypt. The authors wish to gratefully acknowledge staff members of El-Zahra Arab Horse Stud, Cairo, Egypt, and Christine Cooreman for her assistance in preparation of the manuscript. The senior author wishes to thank Dr M. M. Waheed for his valuable collaboration in carrying out the experiment. ❑

σπερματοζωαρίων.

Το πυρουβικό οξύ είναι ένα δυναμικό συστατικό εξουδετέρωσης του $H_2O_2$ (Upreti και συν. 1998). Η προσθήκη του στη συγκέντρωση των 5 mM (~ 0.55 mg/ml) σε αραιωτικά σπέρματος επιβήτορα, που θα συντηρηθεί σε θερμοκρασία 5°C και που έχουν ως βάση το αποβουτυρωμένο γάλα (Bruemmert και συν. 2002) ή σε αραιωτικά κατεψυγμένου σπέρματος ταύρου που έχουν ως βάση τον κρόκο του αυγού (Bilodeau και συν., 2002), προκάλεσε σημαντική αύξηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων και των επιπέδων του ATP. Το 3-υδροξυ-3-μεθοξυκυναμικό οξύ (1.6 mM ~ 0.31 mg/ml) αποτελεί ένα αποτελεσματικό συστατικό στα διάφορα φαρμακευτικά βότανα και έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου, μειώνει την υπεροξείδωση των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης, αυξάνει το ενδοκυτταρικό επίπεδο του cGMP και βελτιώνει τη ζωτικότητα και κινητικότητα των σπερματοζωαρίων του ανθρώπου μετά από επώασή τους σε υπόστρωμα Ham's F-10 για 6 h σε θερμοκρασία 37°C (Zheng and Zhang, 1997).

Η οξείδωση της θειολικής ρίζας ($SH^-$) στις πρωτεΐνες του σπέρματος από το $O^{2-}$ και το $H_2O_2$ βρέθηκε να συνδέεται με την αναστολή της ζωτικότητας και της γονιμοποιητικής ικανότητας του σπέρματος (Mammoto και συν. 1996). Η κατάψυξη του σπέρματος του ταύρου με αραιωτικά που έχουν ως βάση το Tris και τον κρόκο αυγού έχει αποδειχθεί ότι μειώνει σημαντικά τα ενδοκυτταρικά επίπεδα των θειολικών ριζών (Bilodeau και συν. 2000) και η απόψυξη του κατεψυγμένου σπέρματος με θειολικές ρίζες, οι οποίες περιείχαν αντιοξειδωτικά, παρεμποδίζει την απώλεια της ζωτικότητας των σπερματοζωαρίων που προκαλείται από το $H_2O_2$ (Bilodeau και συν. 2001). Σε προηγούμενη εργασία (Khalifa, 2001) με κατεψυγμένο σπέρμα βουβαλιών, η προσθήκη θειοθειϊκού νατρίου (1 mg / ml) σε αραιωτικά που περιείχαν κρόκο αυγού λειτούργησε ως πηγή θειολικών ριζών ως προς τα σπερματοζωάρια και προκάλεσε αξιοσημείωτη βελτίωση της ζωτικότητας των σπερματοζωαρίων, τα οποία διατήρησαν ακέραια την κυτταρική τους μεμβράνη, γεγονός που ενισχύει τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής.

Η είσοδος άφθονης ποσότητας $Ca^{2+}$ στα σπερματοζωάρια βρέθηκε να ταυτίζεται με την ενεργοποίηση των φωσφωλιπασών που δεσμεύονται στη μεμβράνη (Roldan, 1998), καθώς και με την υπεροξειδωτική βλάβη των μεμβρανών τους (Megahed and Anwar, 1997). Η σταθερή επίδραση του ψευδαργύρου στις μεμβράνες των σπερματοζωαρίων βρέθηκε ότι οφείλεται στην ικανότητα του να καταστέλλει την υπεροξείδωση των λιπιδίων διαμέσου της αναστολής των φωσφωλιπασών και να προστατεύει τις θειολικές ρίζες και τα πολυα-

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES


Aitken RJ, Baker MA (2004) Oxidative stress and male reproductive biology. Reprod Fertil Dev, 16:581-588.

Alvarez, JG, Storey BT (1983) Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. Biol Reprod, 29:548-555.

Andrews JC, Nolan JP, Hammerstedt RH, Bavister BD (1994) Role of zinc during hamster sperm capacitation. Biol Reprod, 51:1238-1247.

Ball BA, Vo A (1999) Reactive oxygen species generation by equine spermatozoa. Biol Reprod, 60, (Suppl 1):136-137.

Ball BA, Gravance CG, Medina V, Baumber J, Liu IKM (2000) Catalase activity in equine semen. Am J Vet Res, 61:1026-1030.

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

Baumber J, Vo A, Sabeur K, Ball BA, (2002) Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. Theriogenology, 57:1025-1033.

Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C (2000) Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. Mol Reprod Dev, 55:282-288.

Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon C, Sirard MA (2001) Thiols prevent H2O2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. Theriogenology, 56:275-286.

Bilodeau JF, Blanchette S, Cormier N, Sirard MA (2002) Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. Theriogenology, 57:1105-1122.

Bruemmert JE, Coy RC, Squires EL, Graham JF (2002) Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa stored for up to 48 hours. J Anim Sci, 80: 12-18.

El-Sheltawi MAF, Abdel-Malak MG, Abdel-Malak G, Khalifa TAA (1999) Impact of zinc and tocopherol on functional competence of cryopreserved buffalo spermatozoa. Assiut Vet Med J, 42:291-309.

Engle CE, Foley CW, Witherspoon DM, Scarth RD, Goetsch DD (1975) Influence of mare uterine tubal fluids on the metabolism of stallion sperm. Am J Vet Res, 36:1149-1152.

Halliwell B (1988) Albumin, an important extracellular antioxidant? Biochem Pharmacol, 37:569-571.

Hegab AO, Khalifa TAA (2003) Highlights on biological role of superoxide dismutase activity in buffalo and stallion seminal plasma. Kafr El-Sheikh Vet Med J, 1:867-880.

Hughes CM, Lewis SEM, McKelvey-Martin VJ, Thompson W (1998) The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. Hum Reprod, 13:1240-1247.

Khalifa TAA (2001) Effect of some antioxidants on viability on preserved buffalo and ram semen. Ph.D. Thesis, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, Egypt.

Khalifa TAA, Zaabel SM, El-Boushy ME (2003) Significance of non-sperm cells in equine semen. Zag Vet J, 31:70-77.

Mammoto A, Masumoto N, Tahara M, Ikebuchi Y, Ohmichi M, Tasaka K, Miyake A (1996) Reactive oxygen species block sperm-egg fusion via oxidation of sperm sulfhydryl proteins in mice. Biol Reprod, 55:1063-1068.

Mann T, Lutwak-Mann C (1981) Male reproductive function and semen. Springer-Verlag Berlin Heidelberg Publishers, New York.

κόρεστα λιπαρά οξέα που υπάρχουν στις βιομεμβράνες από την οξείδωση που προκαλείται διαμέσου του $Fe^{2+}$ (Andrews και συν. 1994). Έχει αποδειχθεί ότι η προσθήκη χλωριούχου ψευδαργύρου (1mM ~ 0.14 mg/ml) σε αραιωτικά που περιέχουν κρόκο αυγού προκάλεσε αύξηση της ζωτικότητας του κατεψυγμένου σπέρματος βουβαλιών (El-Sheltawi και συν. 1999), γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής.

Η αλβουμίνη θεωρείται ένα σημαντικό εξωκυτταρικό αντιοξειδωτικό (Alvarez and Storey, 1983) λόγω της ικανότητάς της να δεσμεύει το σημείο μετάπτωσης των ιόντων των μετάλλων ($Fe^{2+}$ and $Cu^{1+}$) σε αραιωτικά που περιέχουν κρόκο αυγού και να ελαχιστοποιεί το σχηματισμό του $^{\bullet}OH$, του κύριου αιτίου πρόκλησης της υπεροξείδωσης των λιπιδίων στα σπερματοζωάρια (Halliwell, 1988; Vishwanath and Shannon, 1997). Παρά το ότι η επώαση των σπερματοζωαρίων του επιβήτορα (Pommer και συν. 2002) και του ταύρου (Bilodeau και συν. 2002) σε αραιωτικό που περιείχε BSA και πυρουβικό νάτριο επιμήκυνε σημαντικά τη διάρκεια ζωής της λειτουργικής τους ικανότητας σε σύγκριση με αραιωτικά που περιείχαν γάλα ή κρόκο αυγού, ορισμένοι ερευνητές αναφέρουν ότι δεν παρατήρησαν καμιά βελτίωση στη ζωτικότητα του κατεψυγμένου σπέρματος του επιβήτορα μετά από προσθήκη BSA (3% w/v) σε αραιωτικά που είχαν ως βάση το γάλα (Ball και συν. 2001).

Από την παρούσα εργασία συμπεραίνεται ότι η κατάψυξη/απόψυξη του σπέρματος του επιβήτορα, στο οποίο προστέθηκαν αντιοξειδωτικά και 0.97 ή 1.94 mg καφεΐνης/ml, βελτίωσε σημαντικά την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία υποστηρίχθηκε τεχνικά από το Τμήμα Αναπαραγωγής της Κτηνιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου του Καΐρου της Αιγύπτου. Οι συγγραφείς θα ήθελαν να ευχαριστήσουν το προσωπικό του El-Zahra Arab Horse Stud, του Καΐρου, Αίγυπτος, καθώς και την Christine Cooreman για την πολύτιμη βοήθειά της στην προετοιμασία αυτής της εργασίας. Οι συγγραφείς επιθυμούν να ευχαριστήσουν τον Dr M. M. Waheed για την πολύτιμη συνεργασία του προκειμένου να έρθει εις πέρας αυτός ο πειραματισμός. ❑

Megahed GA, Anwar MM (1997) Effect of calcium channel blocker on quality of Egyptian buffalo liquid semen. Assuit Vet Med J, 38:142-152.

Milovanov VK, Trubkin GD, Chubenko NS, Tsvetkov IV, Erzin ZK, Meschankin AB (1964) Artificial insemination of livestock in the USSR. Israel program for scientific translations, Jerusalem, pp. 102-104.

Parks JE, Lynch DV (1992) Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. Cryobiology, 29: 255-266.

Pommer AC, Linfor JJ, Meyers SA (2002) Capacitation and acrosomal exocytosis are enhanced by incubation of stallion spermatozoa in a commercial semen extender. Theriogenology, 57:1493-1501.

Roldan ERS (1998). Role of phospholipases during sperm acrosomal exocytosis. Front Biosci, 3:d1109-1119.

Samper, J.C., 2001. Management and fertility of mares bred with frozen semen. Anim. Reprod. Sci. 68, 219-228.

Samper JC, Crabo BG (1993) Assay of capacitated, freeze-damaged and extended stallion spermatozoa by filtration. Theriogenology, 39:1209-1220.

Shannon P, (1965) Contribution of seminal plasma, sperm numbers and gas phase to dilution effects of bovine spermatozoa. J Dairy Sci, 48:1357-1361.

Snedecor GW, Cochran WG, (1980) Statistical methods. 7th edition, J.B.H. Publishing Co., Oxford.

Upreti GC, Jensen K, Munday R, Duganzich DM, Vishwanath R, Smith JF, (1998) Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. Anim Reprod Sci, 51:275-287.

Vishwanath R, Shannon P (1997) Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. Reprod Fertil Dev, 9:321-331.

Zheng RL, Zhang H (1997) Effects of ferulic acid on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm motility, viability, lipid peroxidation and cyclic nucleotides. Free Radic Biol Med 22:581-586.