



Якість деконсервованої сперми бугаїв за дії нанорозмірної форми сукцинатів Zn, Cu і Mn у складі розріджувачів

С. Корнят, М. Шаран, Д. Остапів, А. Корбецький, І. Яремчук, О. Андрушко

m_sharan@ukr.net

Інститут біології тварин НААН,
вул. В. Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна

Метою роботи було порівняльне вивчення впливу різних доз мікроелементів (Cu^{2+} , Zn^{2+} та Mn^{2+}) у формі нанорозмірної форми сукцинатів за введення їх у лактозо-жовтково-гліцеринове середовище для кріоконсервування сперми бугаїв-плідників на фізіологічні та біохімічні показники деконсервованих спермій. Під час проведення досліджень брали свіжо-отримані еякуляти бугаїв ($n=4$), які ділили на частини: контрольну — розріджену промисловим розріджувачем (лактозо-жовтково-гліцериновий) і дослідні, до яких додавали нанорозмірні форми сукцинатів Cu, Mn і Zn (концентрації вихідних розчинів 2–5 г/л) в дозах 0,005, 0,01 та 0,05 мг/мл. Встановлювали такі фізіологічні показники якості еякулятів: об'єм (мл), концентрацію спермій (млрд/мл), кількість живих спермій (%) та динамічні показники спермій (CASA) і виживання (год.); вміст загального протеїну, дихальну активність спермій, активність ензимів-маркерів запліднювальної здатності — сукцинатдегідрогенази (СДГ, од.) і цитохромоксидази (ЦХО, од.) у розріджених еякулятах з внесеними біологічно активними наносполуками. Після розрідження еякулятів було проведено еквілібрацію сперми впродовж трьох годин за температури $+4^{\circ}\text{C}$ і заморожування у термоконтейнері (7 хвилин над парами азоту з подальшим зануренням у рідкий азот). Розморожування сперми проводили у водяній бані за температури $+38^{\circ}\text{C}$ впродовж 20 секунд. Вищевказані фізіологічні та біохімічні показники сперми бугаїв визначали повторно відразу після розморожування. Концентрація спермій у розрідженій спермі бугаїв становила 8,3% від початкової або еякуляти розріджено в 12 разів згідно з технологічними вимогами ($P<0,001$). Кількість живих спермій зменшилася на 12,6% порівняно зі свіжодержаною спермою ($P<0,05$), а виживання спермій за інкубації зменшилося на 6,8% або 7,4 год. Вміст загального протеїну в 100 мл сперми зменшився на 41,3% після розрідження порівняно зі свіжим еякулятом ($P<0,001$). Дихальна активність зменшилася на 11,8 % після розрідження еякулятів. Активність СДГ знизилася на 10,7%, а ЦХО — на 13,0%. Після деконсервації сперми бугаїв-плідників її дихальна активність була вищою в дослідних зразках за умови додавання до середовища 0,05 мг/л Zn^{2+} , 0,05 мг/л Cu^{2+} та 0,05 мг/л Mn^{2+} у вигляді нанорозмірної форми сукцинату. За цих доз вищою була й активність ензимів. Найвищу активність СДГ спостерігали за додавання до середовища для кріоконсервації 0,05 мг/л Zn^{2+} ($P<0,05$), а найнижчу — за додавання 0,01 мг/л Mn^{2+} . Активність ЦХО була найвищою за додавання до середовища для кріоконсервації 0,05 мг/л Cu^{2+} . Оптимальними концентраціями наносукцинатів, які забезпечують нормалізацію окисних процесів у розрідженій спермі бугаїв, є 0,05 мг/л Mn^{2+} , 0,05 мг/л Cu^{2+} і 0,05 мг/л Zn^{2+} . Збільшення концентрацій мікроелементів у розріджувачі понад оптимальні величини інгібує дихальну активність сперми та знижує активність СДГ і ЦХО. Аналогічним цей вплив є і на динамічні показники спермій бугаїв після її розмороження.

Ключові слова: бугаї-плідники, сперма, спермій, еякулят, нанорозмірна форма сукцинату, сукцинатдегідрогеназа, цитохромоксидаза, дихальна активність, кріоконсервування

Методи заморожування статевих клітин знайшли широке застосування у практиці тваринництва [10]. Сьогодні технологія заморожування сперми відпра-

цьована на багатьох видах тварин. Ефективність кріоконсервування сперми значною мірою залежить від складу синтетичних середовищ для заморожування.

Завданням середовищ є забезпечення належного захисту спермій від несприятливих чинників у процесі кріоконсервування внаслідок дії низьких і наднизьких температур [4, 22].

Якість і запліднювальна здатність спермій залежить від фізіологічних характеристик еякулятів плідників. При цьому виживання і стійкість статевих клітин до зовнішніх чинників забезпечуються ферментами сперми, які беруть участь у використанні енергетичних субстратів, руйнуванні активних форм Оксигену (АФО) та знищенні цитотоксичних продуктів обміну. Мікроелементи відіграють важливу роль у регулюванні обмінних процесів у сперміях, оскільки є кофакторами ферментів, які забезпечують енергетичні потреби й утилізацію цитотоксичних продуктів метаболізму клітин. До таких належать Cu^{2+} , Zn^{2+} та Mn^{2+} , які є у складі ферментів гліколізу, дихального ланцюга мітохондрій і антиоксидантного захисту [15]. Зокрема, Zn^{2+} входить в активні центри численних ферментів гліколізу й пентозофосфатного шляху окиснення глюкози, Cu^{2+} забезпечує активність ферментів дихального ланцюга і протеїназ, а Mn^{2+} — ферментів циклу Кребса. Крім того, вказані мікроелементи Cu^{2+} , Zn^{2+} та Mn^{2+} входять до складу першої ланки ферментатичного антиоксидантного захисту — супероксиддисмутази (СОД), тобто є кофакторами ферменту, що перетворює O_2^- і гальмує утворення АФО [3, 11]. Відомо, що СОД у сперміях наявна у трьох генетично зумовлених ізоформах, які містять у каталітичному центрі йони: Mn^{2+} — мітохондріальній; Zn^{2+} і Cu^{2+} — цитоплазматичній і екзоцелюлярній. При цьому доведено, що від активності вказаного ферменту та співвідношення його ізоформ, вмісту Купруму залежить виживання і, відповідно, запліднювальна здатність статевих клітин.

Однак за технологічних процесів підготовки еякулятів до кріоконсервування змінюється природний вміст мікроелементів, що порушує перебіг перетворення субстратів і ресинтез АТФ. Одним зі способів зберегти високі фізіологічні характеристики і запліднювальну здатність статевих клітин є балансування складу розріджувачів еякулятів мікроелементами. Але використання у складі розріджувачів мікроелементів у вигляді неорганічних солей малоефективне [17], що зумовлене перебігом синтетичних процесів у спермі на низькому рівні і, як наслідок, входження мікроелементів з неорганічних солей в метаболізм статевих клітин знижене. Крім того, йони металів стимулюють вільнорадикальне окиснення структур статевих клітин [21]. Застосування органічних форм металів, зокрема наносукцинатів, може усунути недоліки використання неорганічних солей мікроелементів у розріджувачах еякулятів і забезпечити їх залучення в обмінні процеси спермій [9, 13]. Проте в літературі є дані про негативний вплив надлишку мікроелементів на фізіологічні характеристики і запліднювальну здатність спермій [19, 25]. За надлишку вказаних елементів можливе порушення функцій мітохондрій, яке характеризується зниженням фізіо-

логічних характеристик і запліднювальної здатності спермій [14]. Наприклад, надлишок Cu^{2+} у розрідженій спермі барана зумовлює агрегацію спермій через окиснення вільних сульфгідрильних груп до дисульфідних [12]. З огляду на ці питання, багато авторів проводять дослідження з впливу на якість спермій ссавців металів у вигляді нанорозмірних форм або наночастинок [5, 7, 8].

Метою наших досліджень тому було порівняльне вивчення впливу різних доз мікроелементів (Cu^{2+} , Zn^{2+} та Mn^{2+}) у вигляді нанорозмірної форми суцинатів на якість спермій деконсервованих еякулятів бугаїв.

Матеріали і методи

Дослідження провели в Інституті біології тварин НААН, а також на базі Львівського науково-виробничого центру «Західплемресурси», де вивчали вплив додавання різних доз нанорозмірної форми суцинатів металів, розроблених в Українському державному науково-дослідному інституті нанобіотехнологій та ресурсозбереження (м. Київ), внесених до складу середовищ для кріоконсервування, на фізіолого-біохімічні показники сперми бугаїв. Брили свіжоотримані еякуляти бугаїв ($n = 4$), які ділили на частини: контроль — розріджену лактозо-жовтково-гліцеринним розріджувачем, і дослідні, в які додавали нанорозмірні форми суцинатів Cu, Mn і Zn (концентрації вихідних розчинів 2–5 г/л) в дозах 0,005, 0,01 та 0,05 мг/мл.

При взятті еякулятів встановлювали такі фізіологічні показники якості еякулятів: об'єм (мл), концентрацію спермій (млрд/мл), кількість живих спермій (%) та динамічні показники спермій (CASA) і виживання (год.); вміст загального протеїну, дихальну активність спермій, активність ферментів-маркерів запліднювальної здатності — суцинатдегідрогенази (СДГ, од) і цитохромоксидази (ЦХО, од.) як до розрідження, так і в розріджених еякулятах з внесеними біологічно активними нанорозмірними формами суцинатів досліджуваних сполук [2].

Після розрідження еякулятів провели еквілібрацію сперми впродовж 3 год. за температури $+4^\circ\text{C}$ і заморожування у термоконтейнері (7 хв. над парами азоту з подальшим зануренням у рідкий азот). Розморожували сперму у водяній бані за температури $+38^\circ\text{C}$ впродовж 20 сек. Вищевказані фізіологічні та біохімічні показники сперми бугаїв визначали повторно відразу після розморожування. На останньому етапі досліджень на основі фізіолого-біохімічних досліджень було проведено аналіз отриманих результатів і встановлено оптимальні дози наносполук у розбавлених промисловим розріджувачем еякулятах самців.

Усі фізіолого-біохімічні дослідження провели згідно з методиками, описаними у довіднику [24]. Статистичний аналіз отриманого цифрового матеріалу провели за М. О. Плохінським (1969) [16].

Результати й обговорення

Відомо, що результати роботи зі спермою бугаїв-плідників визначаються за фізіологічними і біохімічними показниками нативної свіжоодрержаної сперми, які є основою життєздатності спермій під час інкубування, розрідження, еквілібріції, кріоконсервування та розмороження, а також їх запліднювальної здатності за використання у штучному осіменінні корів та телиць.

У табл. 1 наведено дані про об'єм, концентрацію спермій, кількість живих спермій і виживання спермій, вміст загального протеїну, дихальну активність спермій, активність ензимів-маркерів запліднювальної здатності — СДГ і ЦХО нативних еякулятів бугаїв відразу після отримання та після розрідження. Усі досліджувані показники свіжоотриманої сперми бугаїв — в межах фізіологічної норми [26]. Це свідчить, що для досліджень було вибрано якісні еякуля-

ти від здорових бугаїв-плідників із запліднювальною здатністю, яка відповідає виробничим стандартам.

З наведених у табл. 1 даних також видно, що такий виробничий момент, як розрідження еякулятів бугаїв, дещо зменшує основні якісні показники сперми. Концентрація спермій у розрідженій спермі бугаїв становить 8,3% від початкової або еякуляти розріджено в 12 разів згідно з технологічними вимогами ($P < 0,001$). Кількість живих спермій зменшилася на 12,6% порівняно зі свіжоодрержаною спермою ($P < 0,05$), а виживання спермій за інкубації зменшилося на 6,8% або 7,4 год. Вміст загального протеїну у 100 мл сперми зменшився на 41,3% після розрідження порівняно зі свіжим еякулятом ($P < 0,001$). І це при тому, що у складі жовтку курячого яйця, доданого до середовища для кріоконсервування сперми бугаїв, є протеїни, які частково мали б компенсувати зменшення їх вмісту в навколоспермальному середовищі після розрідження сперми порівняно з цілим еякулятом. Дихальна активність зменшилася на 11,8% після розрідження еякулятів. Активність СДГ знизилася на 10,7% після розрідження, а ЦХО — на 13,0%. Наведені дані показують, наскільки важливою маніпуляцією є розрідження сперми бугаїв і наскільки може погіршитися якість спермій за умови проведенні цієї процедури.

У табл. 2 наведено динамічні показники досліджуваної сперми бугаїв — свіжоодрержаної та після розрідження, виміряні з допомогою комп'ютерної системи оцінки сперми CASA, які також дають певне уявлення про якість спермій. Можна зауважити, що ці значення не виходять за межі фізіологічних норм згідно з літературними даними для свіжоотриманих спермій бугаїв [1, 13, 18, 23, 27]. З наведених даних видно, як впливає розрідження нативних еякулятів бугаїв-плідників на динамічні показники спермій. Після розрідження сперми бугаїв загальна активність спермій (TMOT) вірогідно знизилася на 12,6% порівняно зі свіжоотриманою спермою ($P < 0,05$). Кількість спермій з прямолінійно-поступальним рухом (PMOT) після розрідження зменшилася на 13,3%. Середня швидкість просування головки спермія по середній траєкторії руху (VAP) знизилася на 10,1%, швидкість прямолінійного руху головки спермія уздовж прямого відрізка між початковою і кінцевою точками траєкторії (VSL) зменшилася на 1,2%, а криволінійна швидкість головки спермія (VCL) — на 5,4%.

Ступінь прямолінійності руху спермій (STR) зріс на 9,9% після розрідження еякулятів бугаїв. Ступінь лінійності руху спермій (LIN) підвищився на 4,5%, ступінь відхилення руху спермій (WOB) знизився на 5,1%. Показник середнього бокового відхилення головки спермія або амплітуда латерального зсуву головки спермія від середньої траєкторії руху (ALH) після розрідження сперми знизилася на 31,9% ($P < 0,001$), а частота коливального руху (BCF) зменшилася на 17,3% ($P < 0,05$). Отримані дані вказують на критичність процедури розрідження еякулятів для збереження якості спермій та їх запліднювальної здатності.

Таблиця 1. Фізіолого-біохімічні показники якості свіжоотриманих еякулятів бугаїв та після розрідження ($M \pm m$, $n=4$)
Table 1. Physiological and biochemical indicators of the quality of the freshly obtained bull ejaculates and after dilution ($M \pm m$, $n=4$)

| Показники / Parameters | Свіжоотримані еякуляти бугаїв freshly obtained bull ejaculates | Еякуляти бугаїв після розрідження Bull ejaculates after dilution |
|--|--|--|
| Об'єм, мл / Volume, ml | 4,8±0,23 | — |
| Концентрація спермій, млрд/мл Sperm concentration, billion/ml | 1,2±0,04 | 0,1±0,01*** |
| Кількість живих спермій, % Number of live sperm, % | 82,8±0,34 | 72,4±3,41* |
| Виживання, год. за +4°C Survival, hours at +4°C | 108,7±6,04 | 101,3±7,25 |
| Вміст загального протеїну, мг/100 мл Total protein content, mg/100 ml | 7,5±0,23 | 4,4±0,43*** |
| Дихальна активність, нг-атом O ₂ /хв×0,1 мл сперми/хв. Respiratory activity, ng atom of O ₂ /min×0.1 ml of semen/min. | 3,67±0,62 | 3,24±0,22 |
| Сукцинатдегідрогеназа, МО/год×0,1 мл сперми Succinate dehydrogenase, IU/h×0.1 ml of semen | 46,18±1,65 | 41,22±2,15 |
| Цитохромоксидаза, МО/год.×0,1 мл сперми Cytochrome oxidase, IU/hour×0.1 ml of semen | 52,4±2,22 | 45,6±3,18 |

Примітка. Різниця статично вірогідна для еякулятів бугаїв після розрідження порівняно з даними нативного еякуляту бугаїв: * — $P < 0,05$; ** — $P < 0,01$; *** — $P < 0,001$.

Note. In this table, the difference is statically significant for bull ejaculates after dilution compared with the data of native ejaculate of bulls: * — $P < 0,05$; ** — $P < 0,01$; *** — $P < 0,001$.

Таблиця 2. Динамічні показники спермій, отримані з допомогою системи CASA у свіжоотриманих еякулятах бугаїв та після розрідження ($M \pm m$, $n=4$)
Table 2. Dynamic sperm counts were obtained using the CASA system in freshly obtained bulls ejaculates and after dilution ($M \pm m$, $n=4$)

| Показники / Parameters | Свіжоотримані еякуляти бугаїв Freshly obtained bull ejaculates | Еякуляти бугаїв після розрідження Bull ejaculates after dilution |
|------------------------|---|---|
| TMOT, % | 82,8 \pm 0,34 | 72,4 \pm 3,41* |
| PMOT, % | 74,3 \pm 2,91 | 64,4 \pm 4,37 |
| VAP, μ m/sec | 118,1 \pm 8,06 | 106,2 \pm 9,34 |
| VSL, μ m/sec | 93,4 \pm 4,21 | 92,3 \pm 5,16 |
| VCL, μ m/sec | 143,9 \pm 9,17 | 136,2 \pm 10,72 |
| STR (VSL/VAP), % | 79,1 \pm 3,74 | 86,9 \pm 5,23 |
| LIN (VSL/VCL), % | 64,9 \pm 4,52 | 67,8 \pm 5,62 |
| WOB (VAP/VCL), % | 82,1 \pm 5,14 | 78,0 \pm 4,89 |
| ALH, μ m | 9,6 \pm 0,23 | 6,54 \pm 0,42*** |
| BCF, Hz | 17,9 \pm 0,62 | 14,8 \pm 0,91* |

Примітка. TMOT — загальна активність, %; PMOT — відносний вміст спермій з прямолінійно-поступальним рухом, %; VAP — середня швидкість просування головки спермія по середній траєкторії руху, мкм/с; VSL — швидкість прямолінійного руху головки спермія вздовж прямого відрізка між початковою і кінцевою точками траєкторії, мкм/с; VCL — криволінійна швидкість головки спермія, мкм/с; STR — ступінь прямолінійності руху спермій (VSL/VAP), %; LIN — ступінь лінійності, (VSL/VCL), %; WOB — ступінь відхилення (VAP/VCL), %; ALH — середнє бокове відхилення головки, амплітуда латерального зсуву головки спермія від середньої траєкторії руху, мкм; BCF — частота коливального руху, с⁻¹. Статично вірогідна для еякулятів бугаїв після розрідження порівняно з даними нативного еякуляту бугаїв: * — $P < 0,05$; ** — $P < 0,01$; *** — $P < 0,001$.

Note. TMOT — total motility, %; PMOT — progressive motility, %; VAP — average path velocity, μ m/sec; VSL — straight line velocity, μ m/sec; VCL — curvilinear velocity, μ m/sec; STR — straightness, (VSL/VAP), %; LIN — linearity, (VSL/VCL), %; WOB — wobble (VAP/VCL), %; ALH — amplitude of lateral head displacement, μ m; BCF — beat cross frequency, Hz. The difference is statically significant for bull ejaculates after dilution compared with the data of native ejaculate of bulls: * — $P < 0,05$; ** — $P < 0,01$; *** — $P < 0,001$.

У табл. 3 наведено дані про дихальну активність та активність СДГ і ЦХО у спермі бугаїв після розмороження за додавання нанорозмірних форм сукцинатів металів у лактозо-жовтково-гліцеринний розріджувач. Варто зазначити, що за умови додавання Zn^{2+} до середовища для кріоконсервування після розмороження сперми дихальна активність відталої сперми перевищувала цей показник у всіх дослідних зразках на 5,9–22,8% і виявилася найвищою за додавання 0,05 мг/мл розчину Zn^{2+} ($P < 0,05$). За умови додавання розчину Cu^{2+} у середовище для кріоконсервування у кількості 0,05 та 0,01 мг/мл дихальна активність була вищою, ніж у контролі, відповідно, на 16,0 та 6,8%, а в кількості 0,005 мг/мл значення було меншим на 0,9%. За умови додавання 0,05 мг/мл розчину Mn^{2+} до зразків сперми після розмороження дихальна активність спермій була вищою на 8,9%; за додавання 0,01 мг/мл значення було таким, як і в контрольному зразку, а за 0,005 мг/мл Mn^{2+} — на 1,9% нижчим.

За умови додавання до середовища для кріоконсервування Zn^{2+} різниця активності СДГ між дослідними зразками та контрольним становила 3,9, 4,6 та 18,6%, відповідно, для кількості 0,005, 0,01 та 0,05 мг/мл Zn^{2+} . У всіх трьох випадках активність ензиму була вищою у дослідних зразках порівняно з контролем, а за додавання 0,05 мг/мл Zn^{2+} різниця була вірогідною ($P < 0,05$). Після додавання до розріджувача сперми бугаїв Cu^{2+} рівень СДГ був більшим у всіх дослідних зразках порівняно з контролем, найбільшим — за додавання 0,05 мг/мл Cu^{2+} (20,9%). За умови додавання у середовище 0,05 мг/мл Mn^{2+} встановлено найвищий рівень ензиму, який перевищував контрольний зразок 13,5%.

Рівень ЦХО майже у всіх дослідних зразках перевищував контроль. Найбільші значення зареєстрували за додавання до середовища Zn^{2+} , Cu^{2+} та Mn^{2+} у дозі 0,05 мг/мл у вигляді наноаквасукцинатів. Перевищення становило 8,0, 14,3 та 6,7%, відповідно, для Zn^{2+} , Cu^{2+} та Mn^{2+} найбільшим було за умови додавання Cu^{2+} .

З отриманих даних видно, що дихальна активність сперми бугаїв вища в дослідних зразках за додавання до середовища у вигляді нанорозмірних форм сукцинатів 0,05 мг/л Zn^{2+} , 0,05 мг/л Cu^{2+} та 0,05 мг/л Mn^{2+} , при цьому вищою була й активність ензимів. Найвищу активність СДГ спостерігали за додавання до середовища для кріоконсервації 0,05 мг/л Zn^{2+} ($P < 0,05$),

Таблиця 3. Дихальна активність та активність сукцинатдегідрогенази і цитохромоксидази у спермі бугаїв після розмороження за додавання нанорозмірних форм сукцинатів металів ($M \pm m$, $n=4$)
Table 3. Respiratory activity and succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activity in bull sperm after thawing with the addition of metal nanosized forms of succinates in diluent ($M \pm m$, $n=4$)

| Умови дослідів, мг/мл The experiment conditions, mg/ml | | Дихальна активність, нг-атом O/хв. × ×0,1 мл сперми Respiratory activity, ng atom of O ₂ /min×0.1 ml of semen/min | Ензими / Enzymes | |
|--|-------|---|--|--|
| | | | СДГ, МО/год. × ×0,1 мл сперми Succinate de- hydrogenase, IU/h×0.1 ml of semen | ЦХО, МО/год.× ×0,1 мл сперми Cytochrome oxidase, IU/h×0.1 ml of semen |
| Контроль Control | – | 3,24±0,22 | 41,22±2,15 | 45,6±3,18 |
| Zn ²⁺ | 0,05 | 3,98±0,18* | 48,87±2,12* | 49,25±3,66 |
| | 0,01 | 3,75±0,43 | 43,11±2,38 | 46,18±3,11 |
| | 0,005 | 3,43±0,32 | 42,81±2,63 | 45,62±3,19 |
| Cu ²⁺ | 0,05 | 3,76±0,24 | 49,86±2,24 | 52,14±3,25 |
| | 0,01 | 3,46±0,18 | 46,31±3,38 | 48,12±3,47 |
| | 0,005 | 3,21±0,28 | 42,16±3,27 | 45,94±4,11 |
| Mn ²⁺ | 0,05 | 3,53±0,24 | 46,77±2,22 | 48,67±3,19 |
| | 0,01 | 3,24±0,43 | 39,17±2,65 | 44,63±3,41 |
| | 0,005 | 3,18±0,26 | 42,34±2,17 | 46,88±3,68 |

Примітка. У цій та наступних таблицях різниця статично вірогідна порівняно з контролем: * — $P < 0,05$; ** — $P < 0,01$; *** — $P < 0,001$.
Note. In this and the following tables, the difference is statically significant compared to the control: * — $P < 0,05$; ** — $P < 0,01$; *** — $P < 0,001$.

а найнижчу — за додавання 0,01 мг/л Mn^{2+} ; активність ЦХО найвища за умови додавання до середовища 0,05 мг/л Cu^{2+} .

У табл. 4 наведено загальну активність спермійв у пробах, відносний вміст спермійв з прямолинійно-поступальним рухом, середню швидкість просування голівки спермія по середній траєкторії руху, швидкість прямолинійного руху голівки спермія уздовж прямого відрізка між початковою і кінцевою точками траєкторії та криволінійну швидкість голівки спермійв після розморожування досліджуваних зразків сперми. Найвищу загальну активність спермійв та найвищий рівень спермійв з прямолинійно-поступальним рухом порівняно з контролем спостерігали за умови додавання до середовища для кріоконсервування 0,05 мг/л Zn^{2+} , 0,05 мг/л Cu^{2+} та 0,05 мг/л Mn^{2+} у вигляді нанорозмірних форм сукцинатів. Найнижчий же рівень

спермійв із загальною активністю мали групи, в яких до середовища додавали 0,005 мг/л Cu^{2+} та 0,01 мг/л Mn^{2+} . Найменшим вміст спермійв з прямолинійно-поступальним рухом спостерігали за додавання 0,005 мг/л Zn^{2+} , 0,005 мг/л Cu^{2+} та 0,005 мг/л Mn^{2+} .

Найбільше значення середньої швидкості просування голівки спермія по середній траєкторії руху (VAP) встановлено за додавання до розріджувача 0,05 мг/л Zn^{2+} , 0,05 мг/л Cu^{2+} та 0,05 мг/л Mn^{2+} , а найменше — за додавання 0,005 мг/л Zn^{2+} , 0,005 мг/л Cu^{2+} та 0,01 мг/л Mn^{2+} відповідно. Швидкість прямолинійного руху голівки спермія уздовж прямого відрізка між початковою і кінцевою точками траєкторії (VSL) була найвищою за додавання у середовище 0,05 мг/л Zn^{2+} , 0,05 мг/л Cu^{2+} та 0,05 мг/л Mn^{2+} , а найнижчою — за додавання 0,01 мг/л Zn^{2+} , 0,005 мг/л Cu^{2+} та 0,01 мг/л Mn^{2+} . Криволінійна швидкість голівки спермія (VCL) була найбіль-

Таблиця 4. Динамічні показники TMOT, PMOT, VAP, VSL, VCL у спермі бугаїв після розмороження за додавання нанорозмірних форм сукцинатів металів до лактозо-жовтково-гліцеринового розріджувача ($M \pm m$, $n=4$)
Table 4. Dynamic indices of TMOT, PMOT, VAP, VSL, VCL in sperm of bulls after thawing with the addition of metal nanosized forms of succinates in lactose-yolk-glycerol diluent ($M \pm m$, $n=4$)

| Умови досліджу, мг/л The conditions of the experiment, mg/l | | TMOT, % | PMOT, % | VAP (mm/sec) | VSL (mm/sec) | VCL (mm/sec) |
|--|-------|-----------|-----------|--------------|--------------|--------------|
| Контроль | — | 67,3±4,28 | 53,2±4,89 | 96,3±7,67 | 82,4±6,28 | 105,1±8,37 |
| | 0,05 | 76,3±3,12 | 61,8±4,94 | 99,5±6,84 | 89,2±6,14 | 119,1±5,83 |
| | 0,01 | 68,8±3,11 | 55,3±4,98 | 96,6±6,14 | 78,1±7,54 | 112,3±6,13 |
| | 0,005 | 67,1±3,82 | 51,4±5,72 | 95,2±7,66 | 81,2±7,48 | 109,6±6,17 |
| Zn^{2+} | 0,05 | 72,1±4,23 | 58,2±6,11 | 102,2±7,16 | 93,4±6,08 | 117,2±5,16 |
| | 0,01 | 67,7±4,43 | 56,2±6,91 | 94,6±8,69 | 84,4±6,63 | 111,8±6,43 |
| | 0,005 | 65,9±3,76 | 51,6±5,83 | 90,9±7,11 | 72,9±7,22 | 102,9±7,85 |
| | 0,05 | 71,9±3,19 | 58,8±4,11 | 104,3±6,09 | 87,5±6,14 | 114,1±6,62 |
| Cu^{2+} | 0,01 | 63,3±3,22 | 47,6±5,27 | 93,2±5,84 | 83,7±6,99 | 102,3±9,88 |
| | 0,005 | 67,7±4,14 | 55,7±4,26 | 98,9±7,77 | 84,4±6,22 | 107,3±8,18 |
| | 0,05 | 71,9±3,19 | 58,8±4,11 | 104,3±6,09 | 87,5±6,14 | 114,1±6,62 |
| | 0,01 | 63,3±3,22 | 47,6±5,27 | 93,2±5,84 | 83,7±6,99 | 102,3±9,88 |
| Mn^{2+} | 0,005 | 67,7±4,14 | 55,7±4,26 | 98,9±7,77 | 84,4±6,22 | 107,3±8,18 |
| | 0,05 | 71,9±3,19 | 58,8±4,11 | 104,3±6,09 | 87,5±6,14 | 114,1±6,62 |
| | 0,01 | 63,3±3,22 | 47,6±5,27 | 93,2±5,84 | 83,7±6,99 | 102,3±9,88 |
| | 0,005 | 67,7±4,14 | 55,7±4,26 | 98,9±7,77 | 84,4±6,22 | 107,3±8,18 |

Таблиця 5. Динамічні показники STR, LIN, WOB, ALH, та BCF у спермі бугаїв після розмороження за додавання нанорозмірних форм сукцинатів металів до лактозо-жовтково-гліцеринового розріджувача ($M \pm m$, $n=4$)
Table 5. Dynamic indicators of STR, LIN, WOB, ALH, and BCF in bull sperm after thawing with the addition of metals nanosized forms of succinates of in lactose-yolk-glycerol diluent ($M \pm m$, $n=4$)

| Умови досліджу, мг/л The conditions of the experiment, mg/l | | STR (VSL/VAP), % | LIN (VSL/VCL), % | WOB (VAP/VCL), % | ALH, мкм | BCF, c ⁻¹ |
|--|-------|------------------|------------------|------------------|-----------|----------------------|
| Контроль | — | 85,6±5,23 | 78,4±5,62 | 91,6±4,19 | 4,42±0,33 | 9,17±0,63 |
| | 0,05 | 89,6±4,21 | 75,0±4,94 | 83,5±6,43 | 4,72±0,32 | 10,11±0,61 |
| | 0,01 | 80,8±4,65 | 69,5±4,98 | 86,0±6,87 | 4,39±0,34 | 9,22±0,61 |
| | 0,005 | 85,3±4,56 | 74,1±5,72 | 86,9±6,12 | 4,23±0,39 | 9,15±0,51 |
| Zn^{2+} | 0,05 | 91,4±4,56 | 79,7±5,11 | 87,2±6,22 | 4,84±0,32 | 10,23±0,36 |
| | 0,01 | 89,2±6,23 | 75,5±6,91 | 84,6±7,28 | 4,24±0,34 | 9,45±0,31 |
| | 0,005 | 80,2±6,19 | 70,8±5,83 | 88,3±8,61 | 4,49±0,44 | 9,03±0,35 |
| | 0,05 | 89,8±7,26 | 76,7±5,11 | 91,4±5,43 | 4,95±0,33 | 10,1±0,42 |
| Cu^{2+} | 0,01 | 81,8±6,34 | 81,8±6,27 | 91,1±8,27 | 4,27±0,38 | 9,2±0,48 |
| | 0,005 | 86,3±4,78 | 78,7±4,26 | 92,1±5,87 | 4,49±0,31 | 9,1±0,32 |
| | 0,05 | 89,8±7,26 | 76,7±5,11 | 91,4±5,43 | 4,95±0,33 | 10,1±0,42 |
| | 0,01 | 81,8±6,34 | 81,8±6,27 | 91,1±8,27 | 4,27±0,38 | 9,2±0,48 |
| Mn^{2+} | 0,005 | 86,3±4,78 | 78,7±4,26 | 92,1±5,87 | 4,49±0,31 | 9,1±0,32 |
| | 0,05 | 89,8±7,26 | 76,7±5,11 | 91,4±5,43 | 4,95±0,33 | 10,1±0,42 |
| | 0,01 | 81,8±6,34 | 81,8±6,27 | 91,1±8,27 | 4,27±0,38 | 9,2±0,48 |
| | 0,005 | 86,3±4,78 | 78,7±4,26 | 92,1±5,87 | 4,49±0,31 | 9,1±0,32 |

шою за умови додавання у середовище 0,05 мг/л Zn^{2+} , 0,05 мг/л Cu^{2+} та 0,05 мг/л Mn^{2+} , а найменшою — за додавання 0,01 мг/л Zn^{2+} , 0,005 мг/л Cu^{2+} та 0,01 мг/л Mn^{2+} .

З наведених у табл. 5 даних видно, що ступінь прямолінійності руху спермій, ступінь лінійності, ступінь відхилення середнє бокове відхилення голівки, амплітуда латерального зсуву голівки спермія від середньої траєкторії руху та частота коливального руху також дещо відрізнялися порівняно з цією величиною у зразках контрольних груп та між собою.

Ступінь прямолінійності руху спермій перевищував контроль на 6,8% за умови додавання у середовище 0,05 мг/л Cu^{2+} ; менші значення мали зразки за умови додавання 0,05 мг/л Zn^{2+} та 0,05 мг/л Mn^{2+} ; найменші — за додавання 0,01 мг/л Zn^{2+} , 0,005 мг/л Cu^{2+} та 0,01 мг/л Mn^{2+} у вигляді нанорозмірних форм сукцинатів. Ступінь лінійності руху спермій мало відрізнявся між зразками контрольної та дослідних груп. Ступінь відхилення майже в усіх зразках був нижчим, ніж у контролі. Такі показники, як середнє бокове відхилення голівки або амплітуда латерального зсуву голівки спермія від середньої траєкторії руху та частота коливального руху також незначно відрізнялися між дослідними зразками та контрольним.

Висновки

Для балансування середовища для кріоконсервації сперми бугаїв до фізіологічних меж нативних еякулятів, нормалізації окисного метаболізму і забезпечення виживання спермій у середовище доцільно додавати в 10–20 разів нижчі дози Mn^{2+} , Cu^{2+} і Zn^{2+} у вигляді нанорозмірних форм сукцинатів порівняно з їх аналогами у вигляді неорганічних солей.

Додавання до розріджувача еякулятів бугаїв нанорозмірних форм сукцинатів мікроелементів впливає на інтенсивність окисних процесів у спермі, активність ензимів-маркерів запліднювальної здатності спермій. Оптимальні концентрації наносукцинатів, які забезпечують нормалізацію окисних процесів у розрідженій спермі бугаїв — 0,05 мг/л Mn^{2+} , 0,05 мг/л Cu^{2+} і 0,05 мг/л Zn^{2+} . Збільшення концентрацій цих мікроелементів у розріджувачі понад оптимальні величини інгібує дихальну активність сперми, знижує активність сукцинатдегідрогенази і цитохромоксидази. Аналогічним цей вплив є на динамічні показники спермій бугаїв після процесу кріоконсервування.

Перспективи подальших досліджень

У подальшому плануємо вивчити вплив поєднаного застосування нанорозмірних форм сукцинатів мікроелементів на фізіолого-біохімічні показники спермій розморожених еякулятів бугаїв для розроблення нових та покращення наявних середовищ для кріоконсервування сперми бугаїв.

1. Bompard D, Vázquez RF, Gómez R, Valverde A, Roldán ERS, García-Molina A, Soler C. Combined effects of type and depth of counting chamber, and rate of image frame capture, on bull sperm motility and kinematics. *Anim. Reprod. Sci.* 2019; 209: 106169. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2019.106169.
2. Chuhrij BM, Klevets BO. To the method of determining the activity of oxidizing enzymes in the sperm of bulls. *Breed. Artif. Insem. Cattle*. Kyiv, 1978; 10: 42–45. Available at: <http://digest.iabg.org.ua/reproduction/item/1853-10-011> (in Ukrainian)
3. Eghbali M, Alavi-Shoushtari SM, Asri Rezaii S. Effects of copper and superoxide dismutase content of seminal plasma on buffalo semen characteristics. *Pakistan J. Biol. Sci.* 2008; 11 (15): 1964–1968. DOI: 10.3923/pjbs.2008.1964.1968.
4. Erokhin AS, Epishyna TM, Nikiforov AH. Cryoprotective effect of new synthetic antioxidants in cryopreservation of ram sperm. *Agricult. Biol.* 1996; 6: 19–21. (in Russian)
5. Falchi L, Khalil WA, Hassan M, Marei WFA. Perspectives of nanotechnology in male fertility and sperm function. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 2018; 6 (2): 265–269. DOI: 10.1016/j.ijvsm.2018.09.001.
6. Farrell PB, Foote RH, McArdle MM, Trouern-Trend VL, Tardif AL. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). *J. Androl.* 1996; 17 (3): 293–300. PMID: 8792220.
7. Iftikhar M, Noreen A, Uzair M, Jabeen F, Daim MA, Cappello T. Perspectives of nanoparticles in male infertility: evidence for induced abnormalities in sperm production. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health.* 2021; 18 (4): 1758. DOI: 10.3390/ijerph18041758.
8. Khalil W, El-Hairry MA, Zeidan AEB, Hassan MAE. Impact of selenium nanoparticles in semen extender on bull sperm quality after cryopreservation. *Theriogenol.* 2019; 126: 121–127. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.12.017.
9. Korniat S, Yaremchuk I, Andrushko O, Ostapiv D, Sharan M, Chajkovska O. The intensity of the oxidation processes in the sperm of the boar at the add of metal nanosuccinates to the eco-sperm medium. *Sci. Tech. Bull. State Sci. Res. Cont. Inst. Vet. Med. Prod. Feed Add.* 2019; 20 (2): 352–357 DOI: 10.36359/scivp.2019-20-2.46. (in Ukrainian)
10. Kosenko MV, Chukhrij BM, Kotsiumbas IY, Klevets LO, Kosenko YM, Chaikovska OI, Panych OP. *Reproductive function and andrological examination of bulls*. Lviv, 2007: 186 p. (in Ukrainian)
11. Kuzmina N, Ostapiv D, Huleuk N, Gumeneckiy I. The activity and content of sod isoforms in mail ejaculates and survival of spermatozoa. *Visnyk Lviv Nat. Univ. named after Ivan Franko. Series Biol.* 2012; 59: 44–51. Available at: <http://publications.lnu.edu.ua/bulletins/index.php/biology/article/view/8506> (in Ukrainian)
12. Leahy T, Rickard JP, Aitken RJ, de Graaf SP. D-penicillamine prevents ram sperm agglutination by reducing the disulphide bonds of a copper-binding sperm protein. *Reprod.* 2016; 151 (5): 491–500. DOI: 10.1530/REP-15-0596.
13. Maulana T, Said S. Kinematics motility of frozen-thawed X and Y sperm of Sumba Ongole bull. *IOP Conf. Series: Earth Environ. Sci.* 2019; 387: 012030. DOI: 10.1088/1755-1315/387/1/012030.
14. Nakada K, Sato A, Yoshida K, Morita T, Tanaka H, Inoue SI, Yonekawa H, Hayashi JI. Mitochondria-related male infertility. *PNAS.* 2006; 103 (41): 15148–15153. DOI: 10.1073/pnas.0604641103.
15. Pal RP, Mani V, Mir SH, Singh RK, Sharma R. Importance of trace minerals in the ration of breeding bull — a review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2017; 6 (11): 218–224. DOI: 10.20546/ijcmas.2017.611.026.
16. Plohinskij NA. *Biometrics guide for livestock specialists*. Moscow, Kolos, 1969: 255 p. (in Russian)
17. Rowe MP, Powell JG, Kegley EB, Lester TD, Rorie RW. Effect of supplemental tracemineral source on bull semen quality. *Appl. Anim. Sci.* 2014; 30 (1): 68–73. DOI: 10.15232/S1080-7446(15)30085-1.

18. Selçuk M, Akal E, Esin B, Nizam MY, Genç MD. Comparative evaluation of the effects of different thawing methods on bull sperm characteristics with computer-assisted semen analysis. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2020; 44: 1316–1321. DOI: 10.3906/vet-2007-12.
19. Sengupta P. Environmental and occupational exposure of metals and their role in male reproductive functions. A review. *Drug Chem. Toxicol.* 2013; 36 (3): 353–368. DOI: 10.3109/01480545.2012.710631.
20. Sharan MM, Kornyat SB, Yaremchuk IM, Kusmina NV, Ostapiv DD, Chajkovska OI. Spermatozoa quality after addition of nanosuccinates of metals to diluted ram ejaculates. *Sci. Tech. Bull. State Sci. Res. Cont. Inst. Vet. Med. Prod. Feed Add.* 2018; 19 (2): 273–279. Available at: http://www.scivp.lviv.ua/images/files/Naukovo_tekhnichnyy_byuleten/2018_19_2/43-s.pdf (in Ukrainian)
21. Shergin NP. Sperm biochemistry of farm animals. Moscow, Kolos, 1967: 239 p. (in Russian)
22. Uysal O, Bucak MN. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Vet. Brno.* 2007; 76: 383–390. DOI: 10.2754/avb200776030383.
23. Viquez L, Barquero V, Soler C, Roldan ERS, Valverde A. Kinematic sub-populations in bull spermatozoa: a comparison of classical and Bayesian approaches. *Biol.* 2020; 9 (6): 138. DOI: 10.3390/biology9060138.
24. Vlizlo VV, Fedoruk RS, Ratych IB. *Laboratory methods of investigation in biology, stock-breeding and veterinary.* A reference book. Lviv, Spolom, 2012: 764 p. (in Ukrainian)
25. Wirth JJ, Mijal RS. Adverse effects of low level heavy metal exposure on male reproductive function. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 2010; 56 (2): 147–167. DOI: 10.3109/19396360903582216.
26. Yablonsky VA, Khomyn SP, Zaviryukha VI, Demchuk MV, Stoiika RS, Serhienko OI, Kosenko MV, Kotsiumbas IY, Kusen SY, Siratsky YZ. *Biotechnological and molecular genetic basis of animal reproduction.* Lviv, Afisha, 2009: 218 p. (in Ukrainian)
27. Zăhan M, Pall E, Cenariu M, Miclea I, Dascăl AS. Relationship between *in vitro* semen parameters and bull fertility. *ABAH Bioflux.* 2018; 10 (2): 156–163. Available at: <http://www.abah.bioflux.com.ro/docs/2018.156-163.pdf>

Quality of deconserved bull sperm for the action of nanosuccinates Zn, Cu and Mn in the diluents

S. Kornyat, M. Sharan, D. Ostapiv, A. Korbeckij, I. Jaremchuk, O. Andrushko
m_sharan@ukr.net

Institute of Animal Biology NAAS,
38 V. Stus str., Lviv, 79034, Ukraine

The purpose of this work was to compare effect of different doses of trace elements such as Cu^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} that have been included as nano succinates into lactose-yolk-glycerol medium for cryopreservation of bull sperm and some physiological and biochemical sperm parameters assessment before and after cryopreservation. In this research each fresh ejaculate obtained from 4 bulls has been divided into parties consisting a control sample and its experimental counterparts. Control samples were diluted with industrial lactose-yolk-glycerin diluent only but their experimental counterparts were diluted and supplemented with nano acquacuccinates of Cu, Mn and Zn as solutions at concentration 2–5 g/l but different doses of 0.005, 0.01 and 0.05 mg/ml. When ejaculates were taken, the following physiological parameters of ejaculate quality were established: volume (ml), sperm concentration (billion/ml), live sperm count (%) and dynamic sperm count (CASA) and survival (h); content of total protein, respiratory activity of sperm, activity of enzyme markers of fertilizing ability — succinate dehydrogenase (SDH, units) and cytochrome oxidase (CHO, units) in diluted ejaculates with introduced minerals. After the ejaculates were diluted, semen was equilibrated for three hours at 4°C and frozen in a container (7 min over nitrogen vapor followed by immersion in liquid nitrogen). The semen was thawed in a water bath at 38°C for 20 seconds. The above physiological and biochemical parameters of the sperm of the bulls were redetermined immediately after thawing. Spermatozoa concentration in diluted bull sperm was 8.3% of the initial or ejaculate diluted 12-fold according to technological requirements ($P < 0.001$). The number of live sperm decreased by 12.6% compared to fresh sperm ($P < 0.05$), and the survival of sperm during incubation decreased by 6.8% for 7.4 hours. Total protein content in 100 ml of sperm decreased by 41.3% after dilution compared to fresh ejaculate ($P < 0.001$). Respiratory activity decreased by 11.8% after the ejaculates was diluted. Succinate dehydrogenase activity decreased by 10.7% and cytochrome oxidase activity by 13.0%. In thawed bull sperm the respiratory sperm activity is higher in counterparts when 0.05 mg/l Zn^{2+} , 0.05 mg/l Cu^{2+} and 0.05 mg/l Mn^{2+} are added to the medium. Enzyme activity at the same doses was higher. The highest activity among these groups of succinate dehydrogenase was at 0.05 mg/l Zn^{2+} ($P < 0.05$) added to the cryopreservation medium, and the lowest at 0.01 mg/l Mn^{2+} . Cytochrome oxidase activity was highest when 0.05 mg/l Cu^{2+} was added to the cryopreservation medium. The optimum concentrations of nanosuccinates that ensure the normalization of oxidation processes in the diluted bull sperm are: 0.05 mg/l Mn^{2+} , 0.05 mg/l Cu^{2+} and 0.05 mg/l Zn^{2+} . The higher concentration of metal nano succinates in the diluent inhibits the respiratory sperm activity and reduces the activity of succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase. Similar effect has been estimated in dynamic performance of spermatozoa after thawing.

Key words: bulls, semen, spermatozoa, ejaculate, nanosuccinates, succinate dehydrogenase, cytochrome oxidase, respiratory activity, cryopreservation