

ІНТЕНСИВНІСТЬ ОКИСНО-ВІДНОВНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИЖИВАННЯ СПЕРМІЇВ КНУРІВ ЗА ДОДАВАННЯ В РОЗРІДЖЕНІ ЕЯКУЛЯТИ НАНОСУКЦИНАТІВ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ

Корнят С.Б., к. с.-г. н., s_kornyat.inendiol.com.ua

Андрушко О.Б., к. с.-г. н.,

Кузьміна Н.В., к. біол. н.,

Боднар Ю.В., к. с.-г. н.,

Шаран М.М., д. с.-г. н.,

Остапів Д. Д., д. с.-г. н.

Інститут біології тварин НААН, м. Львів

Анотація. Оскільки спермії кнурів характеризуються пониженою стійкістю до умов зовнішнього середовища, процесів розрідження і тривалого зберігання поза організмом, проводиться пошук ефективних компонентів за введення яких у склад розріджувачів зростуть тривалість виживання та запліднювальна здатність сперміїв. До таких складників належать органічні сполуки мікроелементів, які здатні регулювати інтенсивність окисних процесів у розріджених еякулятах та опосередковано забезпечувати захист статевих клітин від цитотоксичних сполук метаболізму. В зв'язку з цим, досліджували вплив органічної форми (сукцинату) мікроелементів у розріджених фосфатно-сольовим буфером еякулятах кнурів на інтенсивність окисних процесів і виживання сперміїв. Сполуки металів з сукцинатом синтезовані з використанням аквананотехнології.

Встановлено, що еякуляти кнурів характеризуються значними коливаннями величин значень біохімічних показників і виживання сперміїв, що свідчить про індивідуальні особливості самців та мінливість якості сперми при отриманні в різні дні. Виявлено, що вплив наносукцинатів мікроелементів у розріджених фосфатно-сольовим буфером еякулятах кнурів на показники окисних процесів сперми залежить від їх дози. Збільшення вмісту наносукцинатів мікроелементів у розріджених фосфатно-сольовим буфером еякулятах кнурів призводить до вірогідного ($p < 0,01 - 0,001$) зниження дихальної активності сперми. Одночасно встановлено, що додавання у еякуляти кнурів наростаючих доз наносукцинатів мікроелементів зумовлює перерозподіл потоку протонів між сперміями та розріджувачем у бік збільшення їх в позаклітинному середовищі і підвищення потенціалу середовища.

Виявлено слабкий вплив ($\eta = 0,070 - 0,151$) наростаючих доз наносукцинатів мікроелементів у розріджених фосфатно-сольовим буфером еякулятах кнурів на активність сукцинатдегідрогенази. Високе виживання сперміїв кнурів (100,0 - 112,0 год) у фосфатно-сольовому буфері за температури 2-4 °С проявляється за 0,06, 0,004 і 0,01 мг/л Zn-, Cu- і Mn- сукцинатів, відповідно.

Ключові слова: наносукцинати мікроелементів, окисні процеси, виживання, спермії, сперма, розріджувач, кнури

Актуальність проблеми. Спермії кнурів характеризуються пониженою стійкістю до умов зовнішнього середовища, процесів розрідження і тривалого зберігання поза організмом. Вказані особливості визначаються фізіологічними характеристиками еякулятів: великим об'ємом, відносно низькою концентрацією і підвищеним окисним метаболізмом статевих клітин. Крім того, мембрани сперміїв характеризуються високим вмістом ненасичених жирних кислот, що зумовлює пониженою їх стійкістю до окиснювального навантаження після еякуляції. Серед чинників, які здатні підтримувати і нормалізувати метаболізм та захищати структурні компоненти статевих клітин є мікроелементи. Зокрема доведено, що від вмісту мікроелементів в еякулятах кнурів залежать здатність до прямолінійного руху та кількість патологічних форм (зміни розміру голівки, ушкодження хвоста, присутність протоплазматичної краплі) сперміїв [1, 2, 3]. За розрідження й зберігання еякулятів знижується активність ферментів енергетичного обміну та антиоксидантного захисту, окиснюються природні антиоксиданти, що призводить до посилення процесів руйнування і зменшення числа живих сперміїв. Вказані технологічні процеси також призводять і до зменшення вмісту мікроелементів, як кофакторів численних ферментів, у розрідженій спермі. Серед шляхів, якими можливо нормалізувати метаболізм та знизити утворення цитотоксичних продуктів у спермі, в тому числі, активних форм Оксигену, є використання мікроелементів в складі розріджувачів кнурів. Зокрема це стосується Cu, Zn та Mn, які входять в активні центри ферментів антиоксидантного захисту

і здатні нормалізувати інтенсивність утворення активних форм Оксигену та використання субстратів статевими клітинами [4].

Завдання дослідження – вивчити вплив мікроелементів (Cu, Zn та Mn) у формі наносукцинатів на якість сперміїв розріджених еякулятів кнурів.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження проведені в Інституті біології тварин НААН та Львівському науково-виробничому центрі «Західплемресурси». Еякуляти кнурів отримували мануально з режимом використання плідників одна садка два рази на тиждень. Для досліджень відібрані еякуляти об'ємом 100 – 150 мл, концентрацією $90 - 190 \times 10^6$ клітин/мл та активністю 7,5 – 8,0 бала сперміїв. Розріджену фосфатно – сольовим буфером (ФСБ; NaCl–0,8 г, KCl–0,02 г, Na_2HPO_4 –0,11 г, KH_2PO_4 –0,02 г, MgCl_2 –0,01 г, H_2O до 100 мл) сперму ділили на частини: контрольну – без- та дослідні - з додаванням мікроелементів у формі органічної сполуки – сукцинатів: Zn^{2+} - 0,06, 0,6 і 3,0; Cu^{2+} - 0,004, 0,04 та 0,4; Mn^{2+} - 0,01, 0,1 та 1,0 мг/л. Синтез сполук металів з сукцинатом здійснено Українським державним науково-дослідним інститутом нанотехнологій і ресурсозбереження (м. Київ).

У розрідженій спермі визначали виживання сперміїв (год) за температури 2–4°C до припинення прямолінійного поступального руху, споживання кисню – полярографічно (нг-атом $\text{O}/\text{хв} \times 0,1$ мл сперми; С) за температури 38,5°C і відновну здатність - потенціометрично (mV/хв $\times 0,1$ мл С) [5], активність сукцинатдегідрогенази (СДГ, од/(год $\times 0,1$ мл С) [6]. Статистичний аналіз отриманих результатів проведено за Н. А. Плохинським [7].

Результати дослідження. Встановлено, що додавання наносукцинатів мікроелементів у розріджені еякуляти кнурів неоднозначно впливає на дихальну активність і відновну здатність сперми. Так, додавання у ФСБ Zn^{2+} -сукцинатів у дозах 0,06 і 0,6 мг/л призводить до зниження, відповідно, на 20,4 і 47,7 % ($p < 0,001$) споживання кисню, порівняно з контролем (табл. 1). За 3,0 мг/л вказаної наносполуки мікроелементу проявляється найнижча дихальна активність сперми ($0,58 \pm 0,05$ нг-атом $\text{O}/\text{хв} \times 0,1$ мл С), величина значення якої менша на 54,7 % ($p < 0,001$), порівняно з контролем.

Подібні зміни встановлені при дослідженні впливу наростаючих доз Cu^{2+} - і Mn^{2+} -сукцинатів, відповідно: за 0,004 мг/л і 0,01 мг/л дихальна активність на 22,7 і 26,4 % ($p < 0,01$), а за 0,04 і 0,1 мг/л – на 45,4 і 46,9 % ($p < 0,001$) нижча, порівняно з контролем. За додавання 0,4 мг/л Cu^{2+} -сукцинату величина показника ще знижується на 70,4 % ($p < 0,001$) до $0,38 \pm 0,06$ нг-атом $\text{O}/\text{хв} \times 0,1$ мл С, а за 1,0 мг/л Mn^{2+} -сукцинату зростає на 16,1 % порівняно з мінімальною величиною значення, однак залишається на 36,8 % ($p < 0,001$) нижчою ніж в контролі. Аналіз залежності дихальної активності від пропорційно зростаючих доз наносукцинатів мікроелементів середньої сили негативна (Zn^{2+} - $\eta = 0,594$; Cu^{2+} - $\eta = 0,633$; Mn^{2+} - $\eta = 0,534$).

Оцінюванням відновної здатності сперми встановлено, що майже у всіх контрольних зразках потенціал середовища знижується ($n=28$) і тільки в одному величина значення зростає впродовж інкубування. На противагу, додавання наносукцинатів мікроелементів зумовлює зростання потенціалу в розбавленій спермі у більшості зразків за використанням Zn^{2+} - і Mn^{2+} -сукцинатів, а за Cu^{2+} -сукцинату - у всіх. При цьому, величина потенціалу середовища підвищується пропорційно дозі нанометалу в розрідженій спермі - на 0,010 - 0,10 mV/хв $\times 0,1$ мл С.

Таблиця 1

Дихальна активність і відновна здатність сперми кнурів за додавання в розріджені еякуляти сукцинатів мікроелементів

Умови досліджу	мг/л	Дихальна активність, нг-атом $\text{O}/\text{хв} \times 0,1$ мл С		Відновна здатність, mV/хв $\times 0,1$ мл С			
				зниження «-»		підвищення «+»	
		n	$M \pm m$	n	$M \pm m$	n	$M \pm m$
Контроль	--	30	$1,28 \pm 0,08$	28	$0,05 \pm 0,01$	1	$0,05 \pm 0,00$
За додавання наносукцинатів: Zn^{2+}	3,0	4	$0,58 \pm 0,05^{***}$	-	-	4	$0,06 \pm 0,001$
	0,6	4	$0,67 \pm 0,09^{***}$	-	-	4	$0,03 \pm 0,001$
	0,06	4	$1,02 \pm 0,11$	1	$0,004 \pm 0,00$	3	$0,001 \pm 0,001$
η		0,594		-		0,750	
Cu^{2+}	0,4	4	$0,38 \pm 0,06^{***}$	-	-	4	$0,17 \pm 0,001$
	0,04	4	$0,70 \pm 0,09^{***}$	-	-	4	$0,07 \pm 0,001$
	0,004	4	$0,99 \pm 0,21$	-	-	4	$0,05 \pm 0,001$
η		0,633		-		0,930	

Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини

Mn ²⁺	1,0	4	0,81±0,11***	-	-	4	0,01±0,001
	0,1	4	0,68±0,07***	-	-	4	0,02±0,001
	0,01	4	0,94±0,08**	1	0,01±0,00	3	0,001±0,000 1
η		0,534		-		0,915	

Примітка. Різниця статично вірогідна порівняно з контролем: ** p<0,01; *** p<0,001

Наносукцинати мікроелементів у розрідженій спермі впливають на активність СДГ спермійв (таблиця 2). За 0,06 мг/л Zn²⁺-наносукцинату активність ензиму не змінюється (19,0±6,99 од/год×0,1 мл С), а за вищого вмісту (0,6 мг/л і більше) знижується на 29,4 %, порівняно з контролем (табл. 2). Аналогічно, додавання 0,01 чи 0,1 мг/л Mn²⁺-сукцинату в розріджені еякуляти кнурів не змінює активність СДГ, а 1,0 мг/л – на 16,4 % знижує величину показника, порівняно з контролем. Використання в складі розріджених еякулятів кнурів Cu²⁺-сукцинату знижує активність ензиму, порівняно з контролем: за 0,004 і 0,04 мг/л на 24,0 % і за 0,4 мг/л на 34,8 %.

Таблиця 2

Якість спермійв за додавання наносукцинатів мікроелементів у розріджені еякуляти кнурів, M±m

Умови досліджу	мг/л	СДГ, од/год×0,1 мл С		Вживання, год	
		n	M±m	n	M±m
Контроль	-	63	18,4±1,89	69	115,1±7,05
За додавання сукцинатів: Zn ²⁺	3,0	5	13,0±3,63	6	100,0±21,48
	0,6	5	13,0±4,15	6	108,0±19,39
	0,06	5	19,0±6,99	6	112,0±17,59
N		0,070		0,126	
Cu ²⁺	0,4	5	12,0±3,03	6	100,0±15,4
	0,04	5	14,0±4,10	6	104,0±12,2
	0,004	5	14,0±3,85	6	100,0±13,2
N		0,104		0,148	
Mn ²⁺	1,0	5	15,4±3,81	6	88,0±20,13
	0,1	5	20,0±5,10	6	96,0±14,97
	0,01	5	21,4±6,42	6	104,0±12,2
N		0,151		0,077	

Подібна залежність встановлена при аналізі тривалості вживання спермійв за додавання наносукцинатів мікроелементів у розріджені еякуляти кнурів. За мінімальних доз Zn²⁺, Mn²⁺ і Cu²⁺-проявляється тенденція до зниження величини показника на 3,0 – 15 год (2,7 – 13,1 %; p>0,05), яка за максимальних доз наносукцинатів на 15 – 28 год нижча (13,1 – 23,5 %), порівняно з контролем.

Аналіз результатів досліджень свідчить, що зниження дихальної активності сперми зумовлено проникненням органічної форми Zn²⁺, Cu²⁺ чи Mn²⁺ в статеві клітини, включенням в метаболізм та інгібуванням надлишком мікроелементів каталітично активних центрів ензимів, які беруть участь в окисно-відновних процесах. Висновок узгоджується зі встановленим зростанням потенціалу середовища, що вказує на надлишок мікроелементів у розрідженій спермі й можливі порушення метаболізму статевих клітин. Крім того, додавання наростаючих доз (надлишку) наносукцинатів мікроелементів зумовлює тенденцію до гальмування активності ФАД-залежної ланки дихального ланцюга мітохондрій, що проявляється зниженням активності СДГ і, ймовірно, порушенням ресинтезу АТФ. Однак, можливе включення органічної форми мікроелементів в активні центри ензимів антиоксидантного захисту зумовлює їх активування і, відповідно, гальмування вільнорадикального окиснення ліпідних компонентів плазми сперми і мембран статевих клітин та дихальної активності сперми. Зміни біохімічних показників (зниження дихальної активності, активності СДГ і підвищення потенціалу середовища) за дії наростаючих доз наносукцинатів мікроелементів в розріджених еякулятах кнурів визначають тенденцію до зниження вживання спермійв. При цьому, значні коливання середніх арифметичних величин біохімічних показників і вживання спермійв свідчать про індивідуальні особливості кнурів і мінливість якості еякулятів кнурів при отриманні в різні дні [8, 9]

Висновки

1. Вплив сукцинатів мікроелементів у розріджених фосфатно-сольовим буфером еякулятах кнурів на показники окисних процесів сперми залежить від їх дози.
2. Збільшення вмісту сукцинатів мікроелементів у розріджених фосфатно-сольовим буфером еякулятах кнурів призводить до вірогідного ($p < 0,01 - 0,001$) зниження дихальної активності сперми.
3. Додавання сукцинатів мікроелементів у розріджені еякуляти кнурів зумовлює підвищення потенціалу середовища.
4. Виявлено слабкий вплив ($\eta = 0,077 - 0,151$) зростаючих доз цитратів мікроелементів у розріджених фосфатно-сольовим буфером еякулятах кнурів на активність сукцинатдегідрогенази.
5. Високе виживання спермій кнурів (100,0 - 112,0 год) у фосфатно-сольовому буфері за температури 2-4 °C проявляється за доз Zn-, Cu- і Mn- цитратів, відповідно, 0,06, 0,004 і 0,01 мг/л.

Література

1. Massányi P. Concentration of Copper, Iron, Zinc, Cadmium, Lead, and Nickel in Boar Semen and Relation to the Spermatozoa Quality / P. Massányi, J. Trandžík, P. Nad, B. Koréneková, M. Skalická, et. al. //Journal of Environmental Science and Health — 2003. —V. 38.— P. 2643-2651.
2. Massnyi P. Seminal concentrations of trace elements in various animals and their correlations / P. Massnyi, J. Trandzik, P. Nad, R. Toman, M. Skalick, B. Kornekov // Asian J. Androl —2003. —V. 5. —P. 101-104.
3. Ma'chal L. Semen quality parameters and content of selected minerals in boar blood and seminal plasma / L. Ma'chal, M. Hos'ek, Z. Reckova, I. Kr'iva'nek //Pol. J. Natur. Sc. —2007. —V. 22(4) —P. 608-619.
4. Кузьміна Н. В. Активність та ізоформи ензимів малат-аспартатного шунта й антиоксидантного захисту сперми і якість спермій //Автореф. дис. к. б. н. Львів – 2014. 18 с.
5. Штольц К.Ф. Амперометрическое определение ферроцианида в присутствии субклеточных структур / К.Ф. Штольц, И.М. Мосолова, Л.А. Дронова. //Биохимические методы. – М.: Наука, 1980. – С. 147 – 150.
6. Чухрій Б.М., Клевець Л.О., Остапів Д. Д. Колориметричний спосіб визначення активності сукцинатдегідрогенази в спермі бугаїв. //Вісник аграрної науки, —1995 —№ 11 — С. 73–75.
7. Плохинский Н.А. Биометрия. М.: МГУ. — 1970. — С. 53–60.
8. Шостя А. М. Прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз у свиней //Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук. - Львів – 2015 35 с.
9. Корнят С.Б. Якість еякулятів та розбавленої середовищем «Екосперм» сперми кнурів. /С. Б. Корнят, Ю. В. Боднар, О. Б. Андрушко та ін. //Передгірське та гірське землеробство і тваринництво. — 2016. — Вип. 60. — С. 186 - 189.

ИНТЕНСИВНОСТЬ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ И ВЫЖИВАНИЕ СПЕРМИЕВ ХРЯКОВ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ В РАЗБАВЛЕННЫЕ ЭЯКУЛЯТЫ НАНОСУКЦИНАТОВ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ

С. Б. Корнят, к. с.-х. н., s_kornyat.inendiol.com.ua,

О. Б. Андрушко, к. с.-х. н., Н. В. Кузьмина, к. биол. н., Ю. В.

Боднар, к. с.-х. н., М. М. Шаран, д. с.-х. н., Д. Д. Остапів, д. с.-х. н.

Институт биологии животных НААН, г. Львов, Украина

Аннотация. Спермии хряков характеризуются сниженной стойкостью к условиям внешней среды, процессов разбавления и длительного хранения вне организма. Поэтому, проводится поиск эффективных компонентов при введении которых в состав разбавителей повысится длительность выживания и оплодотворяющая способность спермиев. К таким компонентам относятся органические соединения микроэлементов, которые способны регулировать интенсивность окислительных процессов в разбавленных эякулятах и коственно обеспечивать защиту половых клеток от цитотоксических соединений метаболизма. В связи с этим, исследовали влияние органической формы (цитрата) микроэлементов в разбавленных фосфатно-солевым буфером эякулятах хряков на интенсивность окислительных процессов и выживание спермиев. Соединения металлов с лимонной кислотой синтезированы с использованием аквананотехнологии.

Установлено, что эякуляты хряков характеризуются значительными колебаниями величин значений биохимических показателей и выживания спермиев, что свидетельствует о индивидуальных особенностях самцов и изменчивость качества спермы при получении в разные дни. Выявлено, что влияние цитратов микроэлементов в разбавленных фосфатно-солевым

буфером еякулятах хряков на показателі окислительних процесів сперми зависят від їх дози. В частині виявлено, що збільшення вмісту цитратів мікроелементів в розбавлених фосфатно-солевим буфером еякулятах хряков сприяє достовірному ($p < 0,05 - 0,001$) зниженню дихальної активності сперми. Одночасно встановлено, що додавання в еякуляти хряков збільшуваних доз цитратів мікроелементів визначає перерозподіл потоку протонів між сперміями і розбавителем в сторону збільшення їх во внеклеточной среде.

Виявлено слабе впливання ($\eta = 0,070 - 0,151$) збільшуваних доз цитратів мікроелементів в розбавлених фосфатно-солевим буфером еякулятах хряков на активність сукцинатдегідрогенази. Високе виживання сперміїв хряков (100,0 - 112,0 ч) в фосфатно-солевом буфері при температурі 2-4 °С проявляється при 0,06, 0,004 і 0,01 мг/л Zn-, Cu- і Mn-цитратів, відповідно.

Ключеві слова: наносукцинати мікроелементів, окислительні процеси, виживання, спермії, сперма, розбавитель, хряки.

REDOX PROCESSES INTENSITY AND SPERM SURVIVAL AFTER ADDITION OF MICROELEMENT ORGANIC FORMS (SUCCINATES) IN BOAR EJACULATES

S.B. Kornyat, O.B., s_kornyat.inendiol.com.ua, Andrushko, N.V. Kuzmina,

Yu. V. Bodnar, M. M. Sharan, D. D. Ostapiv

Institute of Animal Biology of NAAS, Lviv, Ukraine

Summary. Boar spermatozoa can be characterized by reduced resistance to environmental conditions, liquefaction processes and long-term storage outside the organism. Therefore, researches are conducted for effective components that will increase the duration of survival of spermatozoa and fertilizing ability of sperm. Such ingredients are microelement organic compounds that are able to regulate the intensity of oxidative processes in diluted ejaculates and indirectly ensure the protection of gametes from cytotoxic compounds of metabolism. In this regard, we investigated the effects of microelements organic forms (succinates) in diluted phosphate-buffered saline boar ejaculates on intensity of oxidative processes and survival of spermatozoa. In diluted sperm succinate microelements in doses: Zn²⁺ - 0,06, 0,6 and 3,0; Cu²⁺ - 0,004, 0,04 and 0,4; Mn²⁺ - 0,01, 0,1 and 1,0 mg/l were added. Compounds of metals with succinic acid were synthesized using aquanotechnology. In diluted semen were studied: respiration intensity, redox ability, activity of succinate dehydrogenase and spermatozoa survival.

It was found that ejaculate of boars are characterized by significant fluctuations of biochemical parameters values and survival of spermatozoa, indicating that individual characteristics of males and sperm quality change in different days. It was established, that the influence of succinate microelements in boar ejaculates diluted by phosphate-buffered saline on oxidative processes depends on dose of microelements. In particular, it was found that the increase of succinate microelements in diluted boar ejaculates by phosphate-buffered saline causes ($p < 0,01 - 0,001$) a decrease in respiratory activity of sperm. Correlation ratio between increase of succinate microelements doses and respiration intensity is negative and has medium strength (Zn²⁺ - $\eta = 0,594$; Cu²⁺ - $\eta = 0,633$; Mn²⁺ - $\eta = 0,534$). At the same time we found that the addition of increasing doses of succinate microelements in boar semen caused redistribution of protons between sperm and diluent upwards in their extracellular environment and increase of medium potential.

We found a weak influence ($\eta = 0,070-0,151$) of microelement increasing doses in diluted boar ejaculates by phosphate-buffered saline on succinate dehydrogenase activity. High boar spermatozoa survival (100,0-112,0 hours) manifests in phosphate buffered saline when preserving sperm at temperature 2-4°C after addition of 0.06, 0.004 and 0.01 mg /L Zn-, Mn- and Cu- succinates.

Key words: succinate microelements, oxidative processes, survival, spermatozoa, semen, diluents, boars