

## ВПЛИВ НАНОАКВАХЕЛАТІВ НА БІОЛОГІЧНУ ПОВНОЦІННІСТЬ СПЕРМІЇВ

**В. О. Рокотянська**, аспірант

Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН

*Висвітлено експериментальні дані щодо впливу лактату заліза на якісні показники сперми та формування прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу у спермі кнурів-плідників. Встановлено, що процес інкубування цільної сперми впродовж доби призводить до істотного зниження рухливості спермійв на 9% та їх виживаності на 9,8%. Зниження функціональної активності спермійв відбувається внаслідок зміщення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу в бік посилення процесів пероксидного окиснення.*

**Ключові слова:** сперма кнурів, спермопродукція, пероксидне окиснення, ТБК-активні комплекси, лактат заліза.

**Постановка проблеми.** Одним з основних технологічних процесів при зберіганні сперми тварин є розбавлення її у різних синтетичних середовищах, через низьку їх життєздатність у секретах додаткових статевих залоз [2].

Залежно від складу синтетичних розбавників обмінні процеси у сперміях можливо не тільки контролювати, але і накопичувати та зберігати енергію у клітинах за рахунок поживних речовин та інших компонентів середовища і тим самим подовжити термін виживаності та запліднювальну здатність спермійв [9].

**Аналіз актуальних досліджень.** У забезпеченні збереження цілісності плазматичної мембрани спермія і оптимальних умов проходження акросомної реакції особлива роль належить макро- і мікроелементам [5, 11].

Дослідження зарубіжних вчених вказують на те, що макро- та мікроелементи у спермі тварин мають велике значення завдяки їх ролі в обміні речовин, функціях, виживаності спермійв та стійкості до окислювального стресу [14]. Було показано, що при 3-добовому інкубуванні сперми з високим рівнем цинку менше порушується мітохондріальна функція, а вищі концентрації заліза пов'язані з більшою кількістю живих сперматозоїдів з нормальною морфологією. За допомогою багатofакторного аналізу встановлено, що селен відчутно впливає на параметри якості сперми [12].

Накопичення мікроелементів у великих кількостях є досить токсичним. Їх прямий чи непрямий вплив на структуру і функцію статевих залоз, а також гамет з'ясовано повною мірою. Надмірна кількість або дефіцит будь-якого елемента може призвести до порушення сперматогенезу, зменшення ліпідного та окисного пошкодження тканин сім'яників та

сперматозоїдів, що у підсумку призводить до погіршення відтворювальної здатності свиней [13].

Додавання біологічно активних речовин різної природи у розбавник сперми кнурів може підтримати як функціональну активність, так і морфологічну цілісність статевих клітин та подовжити виживаність і запліднювальну здатність спермійв.

**Мета досліджень** – встановити вплив лактату заліза на якісні показники сперми та формування прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу.

**Матеріали та методи досліджень.** Експерименти були проведені в умовах лабораторії фізіології відтворення Інституту свинарства і агропромислового виробництва НААН. Для досліду були відібрані 5 дорослих кнурів-плідників великої білої породи віком від 18 до 36 місяців, аналогів за віком, живою масою та якістю спермопродукції.

Сперму від кнурів одержували мануальним методом. Якість спермопродукції оцінювали за: об'ємом еякуляту, концентрацією і рухливістю спермійв, а також їх виживаністю протягом тригодинного інкубування за температури 38°C (терморезистентна проба ТРП) згідно з Інструкцією зі штучного осіменіння свиней [7].

В експерименті використовували три групи зразків цільної сперми. I група – контрольна. У дослідні групи додавали розчини, що містили - 0,15 (II група) та 0,3 (III група) мг лактату заліза (ЛЗ). Досліджувані зразки інкубували за температури 38°C протягом 12 та 24 годин.

У досліджуваних зразках визначали рухливість і виживаність спермійв та кількість живих і мертвих спермійв, а також стан прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу.

Для оцінки рівня перебігу пероксидного окиснення у цільній спермі визначали: концентрацію дієнових кон'югатів – спектрофотометрично [3] і ТБК-активних комплексів (альдегіди і кетони) – фотоелектроколориметрично [4]. Рівень антиоксидантного захисту визначали за: активністю супероксиддисмутази (СОД) – фотометрично [1]; активністю каталази (КТ) за методикою з використанням ванадій-молібдатної реакції [6], вмістом відновленої форми глутатіона – фотоелектроколориметрично з реактивом Елмана [10]; концентрацією аскорбінової і дегідроаскорбінової кислот – за кількістю озонів, модифікованим методом [8].

Отриманий цифровий матеріал статистично опрацьовували за допомогою програми Statistica для Windows XP. Для порівняння досліджуваних показників та їхніх міжгрупових різниць використовували t-критерій Ст'юдента, а результат вважали вірогідним за  $p < 0,05$ .

**Виклад основного матеріалу.** Отримані експериментальні дані свідчать про істотний вплив терміну інкубування зразків цільної сперми, а також величини концентрації доданого ЛЗ (табл.1). Так, встановлено, що рухливість спермій знижувалась на 9%, їх виживаність на 9,8% впродовж 24-годинного зберігання.

Додавання ЛЗ істотно знижувало активність спермій після 24-годинного інкубування, де різниця становила між інтактними зразками та II і III групами, відповідно 15,6 ( $p < 0,05$ ) та 18,2% ( $p < 0,05$ ).

Важливо зазначити, що додавання ЛЗ до зразків сперми істотно впливало на виживаність спермій. Так, 12-годинне інкубування з ЛЗ збільшувало виживаність спермій на 7 - 9,2%. Подовження терміну інкубування до 24 годин діяло згубно, знижуючи виживаність спермій у зразках з додаванням лактатів на 16 ( $p < 0,05$ ) (II група) та 35,6% ( $p < 0,01$ ) (III група).

Процес інкубування зразків сперми згубно діяв на їх життєздатність. Так, у проінкубованій спермі кількість живих спермій знижувалася на 11,5 % ( $p < 0,05$ ) (12 годин) та 25,5% ( $p < 0,05$ ) (24 години). Однак додавання ЛЗ незначно підвищувало біологічну повноцінність спермій та їх життєздатність за умови 12-годинної інкубації в межах 3,7 (II група) та 6,3% (III група).

Варто відмітити, що інкубування зразків протягом доби неоднаково вплинуло на кількість живих спермій в еякуляті та їх виживаність: відносно контрольної групи цей показник був більшим, відповідно, на 17,5 ( $p < 0,05$ ) і 8,6% (II група) та менший на 11,6 і 16% (III група).

Таблиця 1

Вплив лактату заліза на якість сперми кнурів плідників,  $M \pm m$ ,  $n=5$ 

Групи зразків сперми	Рухливість,%	Вживаність, %	Кількість живих,%		Кількість мертвих,%	
			до інкубування	ТРП	до інкубування	ТРП
До інкубування						
I	91,60±2,06	85,20±0,19	95,00±2,24	93,20±1,11	5,00±1,41	6,80±0,73
II	91,60±2,06	88,60±0,98	95,00±2,24	91,20±0,96	5,00±1,41	8,80±1,02
III	91,60±2,06	90,80±1,77	95,00±2,24	90,20±1,58	5,00±1,41	9,80±1,11
12 годин інкубування						
I	90,00±1,58	78,00±2,24	84,20±4,14*	80,20±4,86	15,80±2,97	19,80±2,75
II	90,60±1,16	83,40±3,69	86,20±2,82	83,20±2,96	13,80±2,58	16,80±2,58
III	86,20±3,08	85,20±1,59	85,20±3,47	85,20±3,47	14,80±3,28	14,80±3,28
24 години інкубування						
I	83,40±3,17	75,20±3,40	70,80±3,34*	60,40±4,44	29,20±3,49	39,60±3,62
II	70,40±3,83*	63,20±5,73*	83,20±2,06*	65,20±3,40	16,80±1,85	34,80±5,35
III	68,20±3,08*	48,40±3,17**	62,60±4,87	50,80±6,58	37,40±3,78	49,20±4,92

Примітки: \*- $p < 0,05$ ; \*\*- $p < 0,01$  – порівняно з I групою

Встановлено, що активність СОД у цільній спермі на 12-ту та 24-ту годину після інкубування зменшувалася на 38,1% ( $p < 0,01$ ) та 22,6% порівняно з контролем (табл. 2). Додавання лактатів у середовище для 12-годинного інкубування істотно послаблювало цей процес. У зразках цільної сперми після 12- та 24-годинного інкубування функціонування

даного ензиму було меншим, відповідно, на 18,1 та 12,9 % у II групі на 8,06 і 51,6% ( $p < 0,01$ ) у III групі порівняно з контролем.

Активність СОД через 12 годин від початку інкубування у зразках сперми з додаванням ЛЗ була більшою на 32,3% ( $p < 0,05$ ) (II група) та 48,4% ( $p < 0,01$ ) (III група) порівняно з контролем.

**Вплив лактатів заліза на прооксидантно-антиоксидантний  
гомеостаз у спермі кнурів,  $M \pm m$ ,  $n=5$**

Групи зразків	Час, год	Активність каталази $H_2O_2$ /хв./л	Активність супероксиданіон дисмутази у.о./мл	Вміст дієнових кон'югатів мкмоль/л	Вміст ТБК-активних комплексів мкмоль/л
I	0	6,88±1,11	0,310±0,057	15,60±1,13	21,70±1,24
	12	8,76±0,55	0,192±0,092**	18,18±0,63	25,72±1,17
	24	7,42±0,56	0,240±0,057	24,20±0,61**	30±1,73*
II	0	6,88±1,11	0,310±0,057	15,60±1,13	21,70±1,24
	12	11,53±0,58	0,254±0,042*	20,88±0,60*	29,32±2,09*
	24	9,30±1,20	0,270±0,057	25,60±0,54*	32,30±1,10**
III	0	6,88±1,11	0,310±0,057	15,60±1,13	21,70±1,24
	12	7,02±1,15	0,285±0,075**	24,81±0,56**	26,20±0,56
	24	4,12±0,57	0,150±0,054**	28,40±0,47**	22,60±1,10

Примітка: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  – порівняно з I групою

Активність КТ у цільній спермі у процесі інкубування збільшувалася на 27,3% (12 година), та на 7,8% (24 година). У зразках сперми II групи рівень активності цього ензиму зростає на 12-ту та 24-ту годину від початку інкубування на 67,6 та 35,3%. У зразках сперми III групи на 12-ту годину активність каталази істотно не змінювалася, а по закінченню 24-х годин стрімко знижувалася на 40,1%.

Варто зазначити, що суттєву міжгрупову різницю було встановлено після 12-годинного інкубування зразків II групи, де активність цього ензиму збільшувалася на 31,6%, тоді як у зразках III групи зменшувалася на 20%. Таку закономірність відмічено також після 24-годинної витримки зразків.

Встановлено, що кількість дієнових кон'югатів у зразках сперми I групи на 12-ту та 24-ту годину від початку інкубування зростає на 16,5 та 55,1 % ( $p < 0,01$ ).

Аналогічну динаміку вмісту дієнових кон'югатів виявлено й у зразках із додаванням лактатів – підвищення активності після 12- і 24-годинної інкубації відповідно на 33,8 % ( $p < 0,05$ ) та 64,1% ( $p < 0,05$ ), II група, а також на 59% ( $p < 0,01$ ) та 82,05 % ( $p < 0,01$ ), III група.

Інтенсивність перебігу процесу пероксидного окиснення суттєво зростає впродовж інкубування дослідних зразків. Так, міжгрупову різницю за вмістом дієнових кон'югатів на 12 годину інкубування була суттєвою при додаванні 0,3 мг ЛЗ та складала 36,5 % ( $p < 0,01$ ) (III група). Така динаміка була характерною по закінченні добового інкубування, де їх вміст підвищувався на 5,8 %, II група, та 17,4 %, III група, відносно I групи.

Вміст ТБК – активних комплексів у цільній спермі у процесі інкубування збільшувався на 18,5 (12-та година) та 38,2 % ( $p < 0,05$ ) (24-та година). У зразках сперми II групи кількість цього комплексу зростає більш інтенсивно на 12- та 24- годину після інкубування, відповідно, у 35,1% ( $p < 0,05$ ) та 48,8% ( $p < 0,01$ ). Збільшення концентрації ЛЗ призводило до зростання концентрації даного метаболіту на 20,7%, 12 годин інкубування, з наступним зниженням, III група.

Вміст відновленого глутатіону у спермі інтактної групи у процесі інкубування збільшувався на 41% ( $p < 0,01$ ) (12-та година), із наступним зменшенням на 14,8 % (24-та година). У зразках сперми II групи рівень цього комплексу спадає на 12 та 24 годину після інкубування, відповідно, на 25,9 та 21,3% відносно початкового рівня (табл. 3). У зразках III групи на 12-ту та 24-ту годину спостерігалось досить велике зниження - 35,1 ( $p < 0,01$ ) та 62,3% ( $p < 0,01$ ) до початкового рівня дослідження.

Концентрація глутатіону на 12 годину після інкубування у зразках сперми з додаванням ЛЗ знижувалася на 47,4 ( $p < 0,01$ ), II група, та 53,9% ( $p < 0,01$ ), III група, порівняно із I групою.

Вміст аскорбінової кислоти у досліджуваних зразках у процесі інкубування зменшувався на 12,4 (12-та година), та на 43,4% (24 година). Додавання ЛЗ у зразки сперми викликало зниження рівня аскорбату протягом 24-х годин інкубування на 68% ( $p < 0,01$ ) (II група) та на 78% ( $p < 0,01$ ) у зразках (III групи), що свідчить про істотне його використання.

**Вплив лактатів заліза на вміст низькомолекулярних антиоксидантів у спермі кнурів,  $M \pm m$ ,  $n=5$**

Групи зразків	Час, год	Вміст відновленого глутатіону, ммоль/л	Вміст аскорбінової кислоти, ммоль/л	Вміст дегідроаскорбінової кислоти, ммоль/л
I	0	0,305±0,002	19,10±1,56	12,8±0,69
	12	0,430±0,11**	16,73±1,12	14,53±1
	24	0,260±0,057	10,80±0,69	18,11±1,01**
II	0	0,305±0,002	19,10±1,56	12,80±0,69
	12	0,226±0,051**	20,53±1,13	23,40±0,61**
	24	0,240±0,057	6,12±0,61**	30,18±0,58**
III	0	0,305±0,002	19,10±1,56	12,80±0,69
	12	0,198±0,057**	20,84±1,16	28,16±0,59**
	24	0,115±0,054**	4,21±0,53**	32,16±0,56**

Примітки: \*- $p < 0,05$ ; \*\*- $p < 0,01$  – порівняно з I групою

Концентрація дегідроаскорбінової кислоти у зразках сперми I групи у процесі інкубування зростала на 13,5 (12-та година) та 41,5% ( $p < 0,01$ ) (24-та година). Інтенсивність цього процесу прискорювалася з додаванням ЛЗ у зразках II групи. Рівень даної кислоти істотно підвищувався на 12-ту та 24-ту годину, відповідно на 82,8 ( $p < 0,01$ ) та 135,7% ( $p < 0,01$ ).

Для зразків III групи впродовж інкубування встановлено аналогічну динаміку.

Кількість дегідроаскорбінової кислоти у зразках сперми з додавання ЛЗ впродовж її інкубування була більшою. При цьому слід зазначити істотне переважання кількості окисної форми аскорбінової кислоти за відновленою формою, де істотна різниця збільшувалася до 24-ї години інкубування.

**Висновки і перспективи подальших досліджень.**

1. Процес інкубування цільної сперми впродовж 24 годин призводить до істотного зниження рухливості спермій на 9% та їх виживаності на 9,8%. Це зниження функціональної активності спермій відбувається внаслідок зміщення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу в бік посилення процесів пероксидного окиснення.

2. Додавання 0,15 мг лактату заліза до зразків цільної сперми сприяє підвищенню виживаності спермій на 7% впродовж 12-годинного інкубування з наступним зниженням до 24-ї години інкубування. Ці зміни відбуваються на тлі підвищення активності каталази на 31,6% та супероксиддисмутази на 32,3% ( $p < 0,05$ ).

3. Введення лактату заліза в середовище для інкубування у кількості 0,3 мг стимулює процеси пероксидного окиснення – зростання концентрації дієнових кон'югатів на 59% ( $p < 0,01$ ) і ТБК-активних комплексів на 20,7% та зниження активності СОД на 8,06%, що приводить до підвищення функціональної активності спермій. Подовження інкубування до 24-х годин призводить до зниження кількості низькомолекулярних антиоксидантів: глутатіону на 62,3% ( $p < 0,01$ ), аскорбінової кислоти на 78% ( $p < 0,01$ ) та зростання кількості дегідроаскорбінової кислоти на 135,7% ( $p < 0,01$ ), що супроводжується зниженням рухливості на 18,2% ( $p < 0,05$ ) та виживаності спермій на 35,6% ( $p < 0,01$ ).

На перспективу передбачається дослідити вплив наноаквахелатів на якісні показники спермопродуктивності кнурів великої білої породи свиней.

**Список використаних джерел:**

1. Брусов О.С. Влияние природных ингибиторов радикальных реакций на автоокисление адреналина / О.С. Брусов, А.М. Герасимов, Л.Ф. Панченко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1976. – № 1. – С.33-35.
2. Вербицкий П.И. Довідник лікаря ветеринарної медицини / П. Вербицкий, П. Достоевський. –К. : Урожай, 2004. – 124, [653] с.
3. Гаврилов В.Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В. Б. Гаврилов, М.И. Мелкорудная // Лабораторное дело. – 1983. – №3. – С. 33–36.
4. Кайдашев І. П. Посібник з експериментально-клінічних досліджень з біології та медицини / І. П. Кайдашев. – Полтава, 1996. – С. 123 - 128.

5. Комиссарчик Я. Ю. Структура и химический состав клеточных мембран / Я. Ю. Комиссарчик. — М. : Наука, 1975. — С. 8–25.
6. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л. И.Иванова, И. Г. Майорова, Е. В. Токарев // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16 – 19
7. Мельник Ю.Ф. Інструкція із штучного осіменіння свиней / Ю.Ф Мельник. – К.: Аграрна наука. – 2003. – 56 с.
8. Пат. № 67054А Україна, А61В5/00. Спосіб прискороного визначення вмісту С та його ізомерів у спермі кнурів / Коваленко В.Ф, Шостя А.М., Усенко С.О.; заявник і патентовласник Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН; заявл.13.06.2003; опубл. 15.06.2004, Бюл. №6.
9. Плишко Н. Т. Технологии и препараты для повышения воспроизводства животных /Н. Т. Плишко. — Бровары, 2005. — № 6. — 111 с.
10. Шостя А.М. Прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз у плазмі та спермі кнурців у період становлення статевої функції / А. М. Шостя // Свинарство: міжвід. темат. наук. зб. — Полтава, 2014 – Вип. 64. – С. 124–132.
11. Ясуо Кагава. Биомембраны / Ясуо Кагава. — М. : Высшая шк., 1985. — С. 120–165.
12. Agarwal A, Sekhon LH. Oxidative stress and antioxidants for idiopathic oligoasthenoteratospermia: is it justified/ Indian J Urol. 2011;27:74–85.
13. López A., Rijsselaere T., Van Soom A. Effect of organic selenium in the diet on sperm quality of boars. Reprod Domest Anim. 2010.
14. Sharpe RM. Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2010;365:1697–712.

### **В. А. Рокотянская. Влияние наноаквахелатов на биологическую полноценность спермиев.**

*Изложены экспериментальные данные о влиянии лактата железа на качественные показатели спермы и формирование прооксидно-антиоксидантного гомеостаза в сперме хряков-производителей. Установлено, что процесс инкубирования цельной спермы в течение суток приводит к снижению подвижности сперматозоидов на 9% и их выживаемости на 9,8%. Это снижение функциональной активности спермиев происходит в результате смещения прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза в сторону ускорения процессов перекисного окисления.*

**Ключевые слова:** сперма хряков, спермопродукция, перекисное окисление, ТБК-активные комплексы, лактат железа.

### **V. O. Rokotianska. The effect of nanoacquahelates on the biological usefulness of spermatozoons.**

*The experimental data on the effect of ferrous lactate on the qualitative parameters of sperm and the formation of prooxidine-antioxidant homeostasis in the semen of boars is represented. It was established that the incubation of whole semen during the day leads to a significant decrease in sperm motility by 9% and their survival rate of 9.8%. This decrease in the functional activity of spermatozoons occurs as a result of a shift in prooxidant-antioxidant homeostasis toward the acceleration of peroxidation processes.*

**Key words:** sperm of boars, sperm production, peroxidation, TBA-active complexes, iron lactate.