

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ
МЕДИЦИНИ ТА БІОТЕХНОЛОГІЙ ІМ. С. З. ГЖИЦЬКОГО

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ШАРАН ОЛЬГА МИКОЛАЇВНА

УДК 636.32/38:636.082.4:612.616

ДИСЕРТАЦІЯ

КІЛЬКІСНІ ТА ЯКІСНІ ПАРАМЕТРИ СПЕРМИ БАРАНІВ ЗА
ВИКОРИСТАННЯ ВІТАМІНІВ А, D₃, Е, С І НАНОЧАСТИНОК
МАНГАНУ, ЦИНКУ І КУПРУМУ

211 Ветеринарна медицина
21 Ветеринарія

Подається на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____О.М. Шаран

Науковий керівник: **Стефаник Василь Юрійович**, доктор ветеринарних наук, професор, завідувач кафедри акушерства, гінекології та біотехнології відтворення тварин ім. Г. В. Зверєвої Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького

Львів – 2023

АНОТАЦІЯ

Шаран О. М. Кількісні та якісні параметри сперми баранів за використання вітамінів А, D₃, Е, С і наночастинок Мангану, Цинку і Купруму – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора філософії галузі знань 21 – «Ветеринарія», за спеціальністю 211 – «Ветеринарна медицина». – Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького, 2023.

Дисертаційна робота присвячена з'ясуванню впливу вітамінів А, D₃, Е, С у формі ліпосомальної емульсії і наносполук Mn, Zn, Cu на якість еякулятів та запліднювальну здатність сперміїв баранів у період статевого спокою. Експериментально обґрунтовано ефективність додавання до раціону баранів вітамінів А, D₃, Е, С і глюконату цинку у формі ліпосомальної емульсії та наносполук Mn, Zn, Cu до середовища для кріоконсервування сперми, що дозволяє підвищити якість і запліднювальну здатність сперміїв. Наукова новизна розробки підтверджена патентом на винахід (*Гевкан ІІ, Яремчук ІМ, Шаран ОМ, Стефаник ВЮ. Спосіб для стимуляції статевої активності та сперматогенезу у баранів. Патент України на корисну модель № 153959. 2023*).

Дисертаційна робота виконана на кафедрі акушерства, гінекології та біотехнології відтворення тварин імені Г.В. Зверєвої Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького та на базі ФОП «Когут Б.М.» Городоцького району Львівської області та Львівського науково-виробничого центру «Західплемресурси».

Проведено дві серії досліджень. У *першій серії експериментів* було відібрано 12 клінічно здорових баранів породи тексель, віком 2–4 роки, які утримували у чотирьох клітках по три голови у кожній. Дослідження проводили у період статевого спокою (березень–травень). Тварин поділили на дві групи: контрольну і дослідну по 6 голів у кожній. Барани контрольної групи отримували основний раціон, а плідникам дослідної групи індивідуально до

комбікорму впродовж 45 діб додавали ліпосомальну вітамінно-мінеральну добавку у дозі 2 мл на голову на добу, до складу якої входило 200 мг цинку глюконату, 25 тис. МО вітаміну А, 2,5 тис. МО вітаміну D₃, 25 мг вітаміну Е, 50 мг вітаміну С, а також лецитин, твін-20 та деіонізована вода. На початку та у кінці згодовування добавки визначали гематологічні та біохімічні показники, а також концентрацію тестостерону.

Через 45 діб від початку експерименту від баранів впродовж трьох тижнів отримували еякуляти на штучну вагіну з режимом використання плідників дуплетна садка два рази на тиждень. Під час отримання сперми визначали статеву активність баранів, фіксуючи кількість садок на отримання одного еякуляту. Визначали фізіологічні показники якості еякулятів: об'єм, концентрацію спермій, кількість життєздатних спермій (%).

Після оцінювання сперму розріджували лактозо-жовтково-тріс-цитрато-гліцериним середовищем (ЛЖТЦГС), фасували у соломинки 0,25 мл, еквілібрували за температури 4°C впродовж 2,5 годин, заморожували 7 хв над парами азоту і занурювали в азот. Розморожували соломинки у водяній бані 38°C впродовж 10 с.

Після розрідження, еквілібрації та розморожування визначали рухливість, кінетичні показники спермій (CASA), активність сукцинатдегідрогенази (СДГ) та цитохромоксидази (ЦО) у сперміях, а після розрідження та деконсервування – ще додатково активність ензимів антиоксидантного захисту супероксиддисмутази (СОД), глутатіонпероксидази (ГПО) і каталази (КАТ).

Другий етап досліджень проведено на шести клінічно здорових баранах, віком 2–4 роки породи тексель, які утримували у трьох клітках по дві голови у кожній. В еякулятах (n= 36), зібраних на штучну вагіну, оцінювали об'єм, концентрацію спермій та рухливість, а потім розділяли на контрольну та експериментальну (n= 9) фракції. Контрольні зразки сперми розбавляли ЛЖТЦГС, тоді як в експериментальних зразках сперми до середовища додавали наносукцинат Mn та Zn у дозах 2,5, 5,0 та 7,5 мкг/л та Cu у дозах 1,25, 2,5 та 3,75 мкг/л). Аналогічно додавали наноцитрати мікроелементів.

Розріджені зразки сперми фасували в соломинки об'ємом 0,25 мл у дозі 80 млн спермій, еквілібрували протягом 2,5 годин, а потім заморожували в рідкому азоті. Після розморожування визначали активність, виживання, активність СДГ та ЦО, дихальну і відновну активність спермій, вміст протеїнів у сперміях, активність ензимів антиоксидантного захисту СОД, ГПО і КАТ, а також вміст ізозимів каталази у сперміях.

У *першій серії досліджень* встановлено, що під впливом згодовування баранам ліпосомальної добавки з вітамінами А, D₃, Е, С та цинку глюконату у період статевого спокою вірогідно зросли концентрація гемоглобіну, вмісту еритроцитів, та тромбоцитів на фоні зниження вмісту лейкоцитів, що може вказувати на посилення обмінних процесів та інтенсифікацію захисних сил в організмі баранів-плідників. Також вірогідно збільшився вміст загального білка, холестеролу, глюкози та активність АЛТ і АСТ, що вказує на інтенсифікацію енергетичних процесів в організмі тварин.

Згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки у складі раціонів баранів у період статевого спокою спричинило вірогідне зростання концентрації тестостерону у плазмі крові на 56,9 %, підвищило їх статеву активність: кількість садок на еякулят вірогідно зменшилася на 35,0 %.

За згодовування баранам ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки вірогідно збільшився об'єм еякуляту, концентрація спермій та загальна кількість спермій в еякуляті, а також виживання спермій, на фоні зниження дегенерованих спермій. Після еквілібрації збереглася така ж тенденція – активність та виживання спермій були вірогідно вищими, а відсоток дегенерованих спермій – вірогідно нижчий.

Свідченням позитивної дії компонентів ліпосомальної добавки є вірогідне збільшення кінетичних показників спермій баранів: криволінійної (VCL), прямолінійної (VSL) та середньої швидкості (VAP) руху спермій після розрідження, еквілібрації та розморожування.

Згодовування баранам ліпосомальної добавки з вітамінами А, D₃, Е, С та цинку глюконату у період статевого спокою підвищує активність СДГ і ЦО у

сперміях баранів з високою вірогідністю ($P < 0,05-0,001$), що свідчить про підвищення запліднювальної здатності гамет.

Після згодовування вітамінів А, D₃, Е, С та глюконату цинку у формі ліпосомальної емульсії вірогідно знизилася активність СОД з одночасним значним (на 23,3–25,0 %) підвищенням активності ГПО і КАТ ($P < 0,01$), що вказує на високий рівень антиоксидантної здатності сперми через зменшення руйнування мембран сперміїв і виходу із них антиоксидантних ензимів.

Отже, додавання до раціону баранів вітамінів А, D₃, Е, С та глюконату цинку у формі ліпосомальної емульсії стимулює статеву активність плідників та підвищує якісні параметри нативної та деконсервованої сперми.

У другій серії експериментів встановлено зміни якісних параметрів сперми баранів під впливом додавання наносукцинатів та наноцитратів Mn, Zn та Cu до середовища для кріоконсервування. Додавання наносукцинату Mn і Zn в оптимальній дозі 5,0 мкг/л до ЛЖТЦГС вірогідно підвищує активність сперміїв після деконсервування, а також знижує відсоток сперміїв з морфологічними порушеннями. Додавання ж наносукцинату Cu у зростаючих дозах значно знижує активність сперміїв у розмороженій спермі баранів, одночасно підвищуючи відсоток дегенеративних сперміїв.

Мікроскопічним дослідженням сперміїв комп'ютеризованою системою CASA встановлено, що додавання наносукцинату Mn і Zn у дозі 5,0 мкг/л до ЛЖТЦГС вірогідно підвищує кінематичні показники сперміїв VCL, VAP, VSL після деконсервування, збільшуючи водночас коефіцієнти рухливості LIN, STR і WOB. Додавання наносукцинату Cu у зростаючих дозах значно знижує динамічні параметри сперміїв у розмороженій спермі баранів, одночасно знижуючи коефіцієнти рухливості.

Додавання наносукцинату Mn і Zn у дозі 5,0 мкг/л до середовища для заморожування сперми баранів вірогідно підвищує активність ензимів – маркерів запліднювальної здатності сперміїв СДГ та ЦО у сперміях після деконсервування, а додавання наносукцинату Cu у зростаючих дозах значно знижує активність цих ензимів.

За додавання наносукцинату Mn і Zn до середовища для кріоконсервування сперми баранів інтенсифікується активність ензимів антиоксидантного захисту у розморожених сперміях, що вказує на їх вищу якість за оптимальної дози 0,5 мкг/л. Водночас, додавання наносукцинату Cu до ЛЖТЦГС у зростаючих дозах підвищує активність СОД та знижує активність ГПО і КАТ, що свідчить про зниження якості сперміїв.

Проведеними дослідженнями впливу додавання наноцитрату Mn, Zn і Cu ЛЖТЦГС встановлено подібну дію на фізіологічні та біохімічні показники розмороженої сперми баранів як за додавання наносукцинатів вказаних металів. Дія наноцитратів мікроелементів у складі середовища для кріоконсервування сперми на якісні показники деконсервованої сперми баранів значною мірою залежала від дози елемента. Додавання наноцитрату Mn і Zn у оптимальній дозі 5,0 мкг/л до ЛЖТЦГС вірогідно підвищує активність сперміїв після деконсервування та знижує відсоток сперміїв з морфологічними порушеннями. Додавання наноцитрату Cu у зростаючих дозах значно знижує активність сперміїв у розмороженій спермі баранів, одночасно підвищуючи відсоток дегенеративних сперміїв.

Додавання наноцитрату Mn і Zn у дозі 5,0 мкг/л вірогідно підвищує кінематичні показники сперміїв баранів VCL, VAP, VSL після деконсервування, збільшуючи водночас коефіцієнти рухливості LIN, STR і WOB. Додавання наноцитрату Cu у зростаючих дозах значно знижує динамічні параметри сперміїв у розмороженій спермі баранів, одночасно знижуючи коефіцієнти рухливості.

Дослідженням виживаності деконсервованих сперміїв баранів встановлено, що за додавання наноцитрату Mn і Zn у дозі 5,0 мкг/л до ЛЖТЦГС вірогідно підвищується час виживання сперміїв, а додавання наноцитрату Cu у зростаючих дозах значно знижує виживаність статевих клітин.

Активність ензимів – маркерів запліднювальної здатності сперміїв (СДГ і ЦО) за додавання наноцитрату Mn і Zn в оптимальній дозі 5,0 мкг/л до середовища для заморожування сперми баранів вірогідно підвищує активність

сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази у сперміях після деконсервування, а додавання наноцитрату Cu у зростаючих дозах значно знижує активність цих ензимів.

За додавання наноцитрату Mn і Zn до середовища для кріоконсервування сперми баранів спостерігається інтенсифікація активності ензимів антиоксидантного захисту у розморожених сперміях, що вказує на їх вищу якість за оптимальної дози 0,5 мкг/л. Водночас, додавання наноцитрату Cu до ЛЖТЦГС у зростаючих дозах підвищує активність СОД та знижує активність ГПО і КАТ, що свідчить про зниження якості спермій.

Таким чином, додавання наноцитрату Mn і Zn у оптимальній дозі 5,0 мкг/л до середовища для кріоконсервування сперми підвищують якісні параметри та запліднювальну здатність деконсервованих спермій баранів, тоді як додавання наноцитрату Cu знижує характеристики сперми барана після розморожування.

Основні наукові положення та практичні пропозиції, що одержані за результатом виконаних досліджень за темою дисертаційної роботи, використовуються в науковій і навчальній роботі процесі у Львівському Національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького при вивченні дисципліни «Акушерство, гінекологія та біотехнологія розмноження сільськогосподарських тварин з основами андрології» та «Біотехнологія відтворення сільськогосподарських тварин» студентам за напрямком підготовки «Ветеринарна медицина» і «Технологія виробництва та переробки продукції тваринництва».

Ключові слова: баран, сперма, кріоконсервація, ліпосомальна вітамінно-мінеральна добавка, наноцитрат і наносукцинат Mn, Zn, Cu

ANNOTATION

Sharan O. M. Quantitative and qualitative parameters of ram sperm using vitamins A, D₃, E, C and nanoparticles of Manganese, Zinc and Copper – Qualification scientific work with manuscript rights.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in the field of knowledge 21 Veterinary Medicine, specialty 211 “Veterinary Medicine”. – Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies of Lviv, 2023.

The dissertation work is devoted to elucidating the effect of vitamins A, D₃, E, C in the form of a liposomal emulsion and nanocompounds of Mn, Zn, Cu on the quality of ejaculates and the fertilizing ability of ram sperm during the period of sexual rest. The effectiveness of adding vitamins A, D₃, E, C and zinc gluconate in the form of a liposomal emulsion and nanocompounds of Mn, Zn, Cu to the medium for sperm cryopreservation to the diet of rams was experimentally substantiated, which improves the quality and fertilizing ability of sperm. The scientific novelty of the development is confirmed by a patent for the invention (*Gevkan II, Yaremchuk IM, Sharan OM, Stefanyk VY. A method for stimulating sexual activity and spermatogenesis in rams. Patent of Ukraine for a utility model No. 153959. 2023*).

The dissertation was completed at the Department of Obstetrics, Gynecology and Biotechnology of Animal Reproduction named after G.V. Zvereva Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies of Lviv and on the basis of private entrepreneur "Kogut B.M." Horodok district of Lviv region and Lviv research and production center "Zakhidplemresursy".

Two series of studies were conducted. In the first series of experiments, 12 clinically healthy Texel rams aged 2-4 years were selected, which were kept in four cages with three heads in each. The study was conducted during the period of sexual rest (March-May). Animals were divided into two groups: control and experimental, 6 heads each. The rams of the control group received the basic diet, and the breeders of the experimental group were individually added to the combined feed for 45 days with a liposomal vitamin-mineral supplement at a dose of 2 ml per head per day,

which included 200 mg of zinc gluconate, 25 thousand IU of vitamin A, 2,5000 IU of vitamin D₃, 25 mg of vitamin E, 50 mg of vitamin C, as well as lecithin, Tween-20 and deionized water. At the beginning and at the end of supplement feeding, hematological and biochemical indicators, as well as testosterone concentration, were determined.

45 days after the start of the experiment, ejaculates were obtained from the rams for three weeks on an artificial vagina with the mode of using doublet cage breeders twice a week. During the semen collection, the sexual activity of the rams was determined by recording the number of eggs per ejaculate. Physiological indicators of ejaculate quality were determined: volume, concentration of sperm, number of viable sperm.

After evaluation, the sperm was diluted with lactose-yolk-tris-citrate-glycerin medium (LYTCGM), packaged in 0.25 ml straws, equilibrated at a temperature of 4°C for 2.5 hours, frozen for 7 minutes over nitrogen vapor and immersed in nitrogen. Straws were thawed in a 38°C water bath for 10 seconds.

After liquefaction, equilibration and thawing, the motility, kinetic indicators of sperm (CASA), the activity of succinate dehydrogenase (SDH) and cytochrome oxidase (CO) in sperm were determined, and after liquefaction and thawing the activity of the antioxidant protection enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) was additionally determined and catalase (CAT).

The second stage of research was carried out on six clinically healthy rams, aged 2-4 years, of the Texel breed, which were kept in three cages with two heads in each. In the ejaculates (n=36) collected on the artificial vagina, the volume, sperm concentration and motility were evaluated, and then divided into control and experimental (n=9) fractions. The control sperm samples were diluted with LYTCGM, while in the experimental sperm samples Mn and Zn nanosuccinate were added to the medium in doses of 2.5, 5.0 and 7.5 µg/l and Cu in doses of 1.25, 2.5 and 3.75 µg/l). Similarly, nanocitrates of trace elements were added. Diluted sperm samples were packed into 0.25 mL straws at a dose of 80 million sperm, equilibrated for 2.5 hours, and then frozen in liquid nitrogen. After thawing, activity, survival,

activity of SDH and CO, respiratory and regenerative activity of sperm, protein content in sperm, activity of antioxidant protection enzymes SOD, GPx and CAT, as well as content of catalase isozymes in sperm were determined.

In the first series of studies, it was established that under the influence of feeding rams a liposomal supplement with vitamins A, D₃, E, C and zinc gluconate in the period of sexual rest, the concentration of hemoglobin, erythrocyte content, and platelets significantly increased against the background of a decrease in leukocyte content, which may indicate an increase metabolic processes and intensification of protective forces in the body of breeding rams. Also, the content of total protein, cholesterol, glucose and the activity of ALT and AST significantly increased, which indicates the intensification of energy processes in the animal's body.

Feeding a liposomal vitamin-mineral supplement as part of rams' diets during the period of sexual rest caused a probable increase in the concentration of testosterone in the blood plasma by 56.9%, increased their sexual activity: the number of follicles per ejaculate significantly decreased by 35.0%.

When sheep were fed a liposomal vitamin-mineral supplement, ejaculate volume, sperm concentration, and the total number of sperm in the ejaculate, as well as sperm survival, were significantly increased, against the background of a decrease in degenerated sperm. After equilibration, the same trend was maintained – sperm activity and survival were likely higher, and the percentage of degenerated sperm was significantly lower.

Evidence of the positive effect of the components of the liposomal supplement is a significant increase in the kinetic indicators of ram spermatozoa: curvilinear (VCL), straight-line (VSL) and average speed (VAP) of sperm movement after dilution, equilibration and thawing.

Feeding rams a liposomal supplement with vitamins A, D₃, E, C and zinc gluconate during the period of sexual rest increases the activity of SDH and CO in ram sperm with high reliability ($P < 0.05-0.001$), which indicates an increase in the fertilizing ability of gametes.

After feeding vitamins A, D₃, E, C and zinc gluconate in the form of a liposomal emulsion, the activity of SOD significantly decreased with a simultaneous significant (by 23.3-25.0%) increase in the activity of GPx and CAT ($P < 0.01$), which indicates to a high level of antioxidant capacity of sperm due to the reduction of the destruction of sperm membranes and the release of antioxidant enzymes from them.

Therefore, the addition of vitamins A, D₃, E, C and zinc gluconate in the form of a liposomal emulsion to the diet of rams stimulates the sexual activity of sires and increases the quality parameters of native and thawing sperm.

In the second series of experiments, changes in the quality parameters of ram sperm under the influence of adding nanosuccinates and nanocitrates of Mn, Zn, and Cu to the medium for cryopreservation were determined. Addition of Mn and Zn nanosuccinate at an optimal dose of 5.0 µg/l to LYTCGM reliably increases the activity of sperm after thawing, and also reduces the percentage of sperm with morphological disorders. The addition of Cu nanosuccinate in increasing doses significantly reduces the activity of spermatozoa in thawed ram sperm, simultaneously increasing the percentage of degenerate spermatozoa.

Microscopic examination of sperm using the computerized CASA system established that the addition of Mn and Zn nanosuccinate at a dose of 5.0 µg/l to LYTCGM reliably increases the kinematic parameters of sperm VCL, VAP, VSL after thawing, while simultaneously increasing the motility coefficients of LIN, STR and WOB. The addition of Cu nanosuccinate in increasing doses significantly reduces the dynamic parameters of sperm in thawed ram semen, simultaneously reducing the motility coefficients.

The addition of Mn and Zn nanosuccinate at a dose of 5.0 µg/l to the medium for freezing ram sperm significantly increases the activity of enzymes - markers of the fertilizing ability of SDH and CO sperm in sperm after thawing, and the addition of Cu nanosuccinate in increasing doses significantly reduces the activity of these enzymes.

The addition of Mn and Zn nanosuccinate to the medium for cryopreservation of ram sperm intensifies the activity of antioxidant defense enzymes in thawed sperm,

which indicates their higher quality at the optimal dose of 0.5 µg/l. At the same time, the addition of Cu nanosuccinate to LYTCGM in increasing doses increases the activity of SOD and decreases the activity of GPx and CAT, which indicates a decrease in sperm quality.

The conducted studies of the effect of adding nanocitrate of Mn, Zn, and Cu to LYTCGM have established a similar effect on the physiological and biochemical indicators of thawed ram sperm as the addition of nanosuccinates of the specified metals. The effect of nanocitrates of trace elements in the medium for cryopreservation of sperm on the quality parameters of thawed ram sperm depended to a large extent on the dose of the element. Addition of Mn and Zn nanocitrate at an optimal dose of 5.0 µg/l to LYTCGM significantly increases the activity of sperm after thawing and reduces the percentage of sperm with morphological disorders. The addition of Cu nanocitrate in increasing doses significantly reduces sperm activity in thawed ram semen, simultaneously increasing the percentage of degenerate sperm.

The addition of Mn and Zn nanocitrate at a dose of 5.0 µg/L significantly increases the kinematic parameters of VCL, VAP, VSL ram sperm after thawing, while increasing the motility coefficients of LIN, STR and WOB. The addition of Cu nanocitrate in increasing doses significantly reduces the dynamic parameters of sperm in thawed ram semen, simultaneously reducing the motility coefficients.

A study of the survival of thawed ram spermatozoa found that the addition of Mn and Zn nanocitrate at a dose of 5.0 µg/l to LYTCGM probably increases the survival time of sperm, while the addition of Cu nanocitrate in increasing doses significantly reduces the survival of germ cells.

The activity of enzymes - markers of the fertilizing ability of sperm (SDH and CO) when adding Mn and Zn nanocitrate in an optimal dose of 5.0 µg/l to the medium for freezing ram sperm probably increases the activity of succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase in sperm after thawing, and the addition of Cu nanocitrate in growing doses significantly reduces the activity of these enzymes.

With the addition of Mn and Zn nanocitrate to the medium for cryopreservation of ram sperm, there is an intensification of the activity of antioxidant protection

enzymes in thawed sperm, which indicates their higher quality at the optimal dose of 0.5 µg/l. At the same time, the addition of Cu nanocitrate to LYTCGM in increasing doses increases the activity of SOD and decreases the activity of GPx and CAT, which indicates a decrease in the quality of sperm.

Thus, the addition of Mn and Zn nanocitrate at an optimal dose of 5.0 µg/L to the sperm cryopreservation medium increases the quality parameters and fertilizing ability of thawed ram sperm, while the addition of Cu nanocitrate reduces the characteristics of ram sperm after thawing.

The main scientific provisions and practical proposals obtained as a result of the research on the topic of the dissertation work are used in the scientific and educational process at the Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv studied the disciplines "Obstetrics, gynecology and biotechnology of reproduction of agricultural animals with the basics of andrology" and "Biotechnology of reproduction of agricultural animals" to students in the field of training "Veterinary medicine" and "Technology of production and processing of livestock products".

Key words: ram, sperm, cryopreservation, liposomal vitamin-mineral supplement, nanocitrate and nanosuccinate Mn, Zn, Cu

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

*Наукові праці, у яких опубліковані основні наукові результати дисертації.
Статті у фахових наукових виданнях України:*

- 1 **Шаран ОМ.**, Стефаник ВЮ. Гематологічні показники та якість сперми баранів під час статевого спокою за згодовування ліпосомальної добавки. *Біологія тварин*, 2022; 24 (4): 12–16. <https://doi.org/10.15407/animbiol24.04.012> (Здобувачка брала участь у проведенні дослідів, обробці експериментальних даних та описі результатів дослідження).
- 2 **Шаран ОМ.** (2023). Якість сперми баранів за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки у період статевого спокою. *НВ ЛНУ ветеринарної медицини та біотехнологій. Серія: Ветеринарні науки*, 25(111), 84-89. <https://doi.org/10.32718/nvlvet11113>.
- 3 **Sharan O.**, Stefanyk V., Murawski M. T. The quality of ram spermatozoa after thawing with the addition of Mn^{2+} , Zn^{2+} and Cu^{2+} nanocitrate to cryopreservation diluent. *The Animal Biology*, 2023; 25 (2): 8–13. <https://doi.org/10.15407/animbiol25.02.008> (Здобувачка брала участь у проведенні дослідів, обробці експериментальних даних та описі результатів дослідження).
- 4 **Sharan, O.**, Stefanyk, V., & Ostapiv, D. (2023). Якість та запліднювальна здатність сперміїв після додавання наносукцинатів Mn, Cu, Zn до розріджувача сперми барана. *НВ ЛНУ ветеринарної медицини та біотехнологій. Серія: Ветеринарні науки*, 25(110), 142-148. <https://doi.org/10.32718/nvlvet11024> (Здобувачка брала участь у проведенні дослідів та інтерпретації отриманих результатів дослідження).
- 5 **Шаран ОМ.** Кінематичні показники та дихальна активність деконсервованих сперміїв баранів за додавання наноцитрату Mn, Zn та Cu до середовища для кріоконсервування. *Біологія тварин*, 2023; 25 (3): 23–30. <http://doi.org/10.15407/animbiol25.03.023>

Патент України

Гевкан П, Яремчук ІМ, **Шаран ОМ**, Стефаник ВЮ. Спосіб для стимуляції статеві активності та сперматогенезу у баранів. Патент України на корисну модель № 153959. 2023 Вер. 29 (*Здобувачка була співавтором ідеї корисної моделі і виконала експериментальні дослідження*).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації.

Тези наукових доповідей:

1. **Sharan O**, Stefanyk V, Ostapiv D. Quality of ram spermatozoa in diluent with addition of Cu^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} nanocitrate as microelement after thawing. *The 1st Ukrainian-Polish Scientific Forum AGROBIOPERSPECTIVES 29–30 September 2021, Lviv, Ukraine. The Animal Biology*, 2021; 23 (3): 106.
2. **Шаран О.М.**, Стефаник В.Ю., Остапів Д.Д. Якість сперміїв баранів за додавання наносукцинатів Cu^{2+} , Zn^{2+} і Mn^{2+} до розріджувачів після деконсервування. *Матеріали II Конференції «Сучасні методи діагностики, лікування та профілактика у ветеринарній медицині»*, 18-19 листопада 2021, м. Львів.
3. **Шаран ОМ.**, Стефаник ВЮ. Якість сперміїв баранів за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки в період статевих спокою. *XX Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених 19 травня 2022 року, м. Львів, Україна. Біологія тварин*, 2022; 24 (2): 74.
4. **Шаран ОМ.** Якісні параметри сперми баранів у період статевих спокою за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки. *XXI Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених 18–19 травня 2023 року, м. Львів, Україна. Біологія тварин*, 2023; 25 (2): 79.

Публікація, яка додатково відображає наукові результати дисертації

Stetsyshyn Y, Raczowska J, Harhay K, Awsiuk K, Shymborska Y, Nastyshyn S, Ohar H, Vasilyev V, Ostapiv D, Sharan M, **Sharan O**, Voronov S. Grafted polymer brush coatings for growth of cow granulosa cells and oocyte-cumulus cell complexes /Y. Stetsyshyn, // *Biointerphases*, American Vacuum Society. 2020/
<https://doi.org/10.1116/6.0000183> (Scopus, Q2)

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	18
ВСТУП.....	19
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	24
1.1. Репродуктивна здатність баранів залежно від чинників довкілля.....	24
1.2. Роль вітамінів А, D, Е, С та мікроелементів Zn, Mn і Cu у репродукції самців жуйних.....	27
1.3. Функціональні, ультраструктурні та біохімічні зміни у сперміях під час кріоконсервування та способи їх усунення.....	37
1.4. Застосування наночастинок для підвищення відтворювальної здатності самців.....	44
1.5. Узагальнення огляду літератури.....	47
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	49
2.1. Загальна схема досліджень.....	49
2.2. З'ясування впливу згодовування ліпосомальної вітамінно- мінеральної добавки у період статевго спокою на статеву активність баранів і якісні параметри сперми у процесі кріоконсервування.....	50
2.3. Дослідження якості деконсервованих сперміїв баранів за додавання наносукцинату і наноцитрату Zn, Mn, Cu до складу середовища для кріоконсервування сперми.....	53
2.4. Дослідження крові піддослідних баранів.....	55
2.5. Дослідження сперми баранів-плідників.....	55
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	58
3.1. Статева активність та якість сперми баранів у період статевго спокою за додавання ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки до раціону.....	58
3.1.1. Гематологічні показники баранів під впливом згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки.....	58

3.1.2. Біохімічні показники крові баранів за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки.....	60
3.1.3. Статева активність баранів у період статевого спокою за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки.....	62
3.1.4. Якісні параметри сперми баранів після згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки.....	63
3.1.4.1. Якість розрідженої сперми баранів після згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки.....	64
3.1.4.2. Якість сперми баранів після еквілібрації за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки.....	67
3.1.4.3. Якість деконсервованої сперми баранів після згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки.....	70
3.2. Якісні показники сперми баранів за додавання наносукцинату і наноцитрату Mn, Zn і Cu до середовища для кріоконсервування.....	75
3.2.1. Якісні показники сперми баранів за додавання наносукцинату Mn, Zn і Cu до середовища для кріоконсервування.....	75
3.2.2. Якісні показники сперми баранів за додавання наноцитрату Mn, Zn і Cu до середовища для кріоконсервування.....	93
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	113
ВИСНОВКИ.....	125
РЕКОМЕНДАЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ.....	127
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	128
ДОДАТКИ.....	160

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК – активні форми кисню;

ГПО – глутатіонпероксидаза;

ГК – глютамінова кислота;

КАТ – каталаза;

ЛЖТЦГС – лактозо-жовтково-тріс-цитратно-гліцеринове середовище;

НЧ – наночастинки;

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів;

СДГ – сукцинатдегідрогеназа;

СОД – супероксиддисмутаза;

ЦО – цитохромоксидаза;

VAR – velocity average path / середня швидкість руху спермія, мкм/с;

VCL –velocity curvilinear / криволінійна швидкість, мкм/с;

VSL – velocity straight line / прямолінійна швидкість, мкм/с;

LIN – linearity / лінійність, %;

STR – straightness / прямолінійність, %;

WOB – wobble / коливання, %.

ВСТУП

Актуальність теми. Успішне розведення овець неможливе без використання біотехнологічних методів відтворення, першим з яких є штучне осіменіння. Водночас, штучне осіменіння вимагає постійної наявності сперми генетично цінних баранів [1]. Оскільки вівці сезонні тварини, то статева активність як самок, так і самців активніше проявляється у парувальний сезон [2, 3]. У цей період увага власників тварин та фахівців зосереджена на посиленій годівлі та утриманні тварин, що дозволяє отримувати високі результати запліднення вівцематок. Зокрема, важливо балансувати раціони баранів та вівцематок вітамінами та мікроелементами.

Відомо, що у період статевого спокою норми споживання вітамінів та мікроелементів на 25–50 % нижчі, ніж у парувальний сезон, очевидно знижує якісні показники сперми баранів [4–7]. Тому для підвищення статевої активності та якості сперми баранів у період статевого спокою необхідно збільшити норми споживання вітамінів і мікроелементів до рівня парувального сезону.

У зв'язку з цим для підвищення якісних показників сперми нами запропоновано розроблену кормову добавку у формі ліпосомальної емульсії для підгодівлі баранів у період статевого спокою. Виникає потреба з'ясувати вплив згодовування ліпосомальної кормової добавки на гематологічні показники та якість сперми баранів у період статевого спокою.

Відомо, що у процесі заморожування сперми виникають ультраструктурні, біохімічні та функціональні зміни сперміїв. Особливо кричущими є плазма сперміїв і акросоми, внаслідок чого збільшується проникність клітинних мембран і виникають порушення рухливості сперміїв та їх морфології [8, 9]. Для забезпечення належного захисту сперміїв від несприятливих чинників за дії низьких температур використовують середовища для кріоконсервування, до складу яких додають мікроелементи [10].

Для усунення недоліків використання неорганічних солей мікроелементів у розріджувачах еякулятів останнім часом застосовують органічні форми

металів, зокрема наносукцинатів, що дозволить забезпечити їх включення в обмінні процеси спермійв [11, 12].

В останні роки в Україні за допомогою нанотехнології отримано надчисті карбоксилати основних харчових кислот і біотичних елементів (Zn, Mg, S, Mn, Fe, Cu, Co, Mo, Cr, I, Se) [13, 14]. Проведено дослідження із з'ясування фізіолого-біохімічних механізмів дії наноаквацитратів мікроелементів в організмі тварин і визначено їх токсичні дози, які виявились у 6–8 разів нижчими від їхніх мінеральних солей [15, 16]. Також проведено експерименти з вивчення впливу додавання наносукцинату Zn, Mn та Cu до розріджувачів сперми бугаїв, у яких з'ясовано позитивну дію наносукцинату мангану та цинку на якісні параметри спермійв [17, 18]. У зв'язку з наведеним вище доцільно дослідити вплив наносукцинату та наноцитрату Mn, Zn та Cu у складі розріджувачів сперми на якісні показники спермійв баранів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконувалась як складова науково-дослідних робіт Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З.Гжицького за державною програмою «Діагностика, лікування і профілактика акушерських, гінекологічних та андрологічних захворювань тварин з використанням новітніх технологій» (номер державної реєстрації 0121U112819).

Мета та завдання досліджень. Мета дисертаційної роботи полягала у з'ясуванні впливу вітамінів А, D₃, Е, С у формі ліпосомальної емульсії і наносполук Mn, Zn, Cu на кількісні та якісні параметри сперми баранів у період статевого спокою.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання:

- дослідити біохімічні показники крові баранів за згодовування вітамінів А, D₃, Е, С і глюконату Zn у формі ліпосомальної емульсії в період статевого спокою;
- з'ясувати вплив комплексного ліпосомального вітамінно-мінерального препарату на статеву поведінку баранів у період статевого спокою;

- дослідити якість сперми у процесі кріоконсервування за згодовування вітамінів А, D₃, Е, С і глюконату Zn у формі ліпосомальної емульсії в період статевго спокою;
- встановити дію наносукцинату і наноцитрату Mn, Zn і Cu у складі розріджувача на рухливість, морфологічні порушення та виживаність спермій баранів після розморожування;
- дослідити дихальну і відновну активність та запліднювальну здатність деконсервованих спермій баранів за додавання наносукцинату і наноцитрату Mn, Zn і Cu до середовища для кріоконсервування;
- з'ясувати вплив наносполук Mn, Zn і Cu у складі розріджувача на стан антиоксидантного захисту деконсервованих спермій баранів.

Об'єкт дослідження – кількість та якість спермопродукції баранів за впливу комплексного ліпосомального вітамінно-мінерального препарату і наносполук Mn, Zn, Cu.

Предмет досліджень – якісні параметри сперми баранів у процесі кріоконсервування за дії вітамінів А, D₃, Е, С у формі ліпосомальної емульсії і наносполук Mn, Zn, Cu у період статевго спокою.

Методи дослідження: ветеринарні, зоотехнічні, андрологічні, біотехнологічні, біохімічні, статистичні, аналітичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше теоретично обґрунтовано та експериментально доведено ефективність застосування вітамінів А, D₃, Е, С і глюконату Zn у формі ліпосомальної емульсії баранам-плідникам у період статевго спокою. Наукова новизна розробки підтверджена патентом на винахід (Гевкан ІІ, Яремчук ІМ, **Шаран ОМ**, Стефанік ВЮ. *Спосіб для стимуляції статевої активності та сперматогенезу у баранів. Патент України на корисну модель № 153959. 2023 Вер. 29*).

Вперше з'ясовано вплив згодовування вітамінів А, D₃, Е, С і глюконату Zn у формі ліпосомальної емульсії баранам-плідникам у період статевго спокою на якість сперми у процесі кріоконсервування.

Вперше встановлено позитивну дію та оптимальні дози наносукцинату і наноцитрату Mn, Zn і Cu у складі середовища для кріоконсервування на рухливість, морфологічні порушення та виживаність розморожених спермійів баранів. Розширено наукові дані щодо впливу наносукцинату і наноцитрату Mn, Zn і Cu у складі середовища для кріоконсервування на кінематичні показники та активність ензимів антиоксидантного захисту спермійів у процесі глибоко заморожування.

Експериментально доведено, що наносукцинат і наноцитрат Mn і Zn в оптимальній дозі у складі середовища для кріоконсервування, підвищують рухливість, виживання, запліднювальну здатність та антиоксидантний захист деконсервованих спермійів баранів.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено спосіб стимуляції статевої активності та сперматогенезу у баранів застосуванням вітамінів A, D₃, E, C і глюконату Zn у формі ліпосомальної емульсії у період статевого спокою. Встановлено оптимальну дозу та тривалість згодовування ліпосомального вітамінно-мінерального препарату, що підвищує кількісні та якісні показники сперми баранів-плідників у період статевого спокою.

Встановлено оптимальні дози наносукцинату і наноцитрату Mn і Zn у складі розріджувача, які підвищують рухливість та запліднювальну здатність спермійів, що слугуватиме основою удосконалення середовища для кріоконсервування сперми баранів.

Основні наукові положення та практичні пропозиції, що одержані за результатом виконаних досліджень за темою дисертаційної роботи, використовуються в науковій і навчальній роботі у Львівському національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького при викладанні дисципліни «Акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин» студентам за напрямком підготовки «Ветеринарна медицина».

Особистий внесок здобувача. Дисертанткою особисто проведено пошук, опрацювання та аналіз наукової літератури за темою дисертації, виконано

експериментальні дослідження, статистичний аналіз та обґрунтування отриманих результатів, підготовлено наукові праці до публікації.

Спільно з науковим керівником визначено напрям, мету і завдання дисертаційних досліджень, сформовано висновки та практичні рекомендації.

Окремі етапи лабораторних досліджень виконані під керівництвом науковців лабораторії молекулярної біології та клінічної біохімії Інституту біології тварин НААН.

Апробація роботи. Основні положення дисертаційної роботи доповідались автором та були обговорені на: I українсько-польському науковому форумі «Агробіоперспективи» (Інститут біології тварин НААН, Львів, 2021); Науковій конференції «Сучасні методи діагностики, лікування та профілактики у ветеринарії» (Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького, 2021); XX Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених (Інститут біології тварин НААН, Львів, 2022); XXI Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених (Інститут біології тварин НААН, Львів, 2023 р.).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 9 наукових праць, в тому числі: 5 статей у наукових фахових виданнях; 4 тези у матеріалах вітчизняних і міжнародних конференцій, а також патент України на корисну модель.

Структура та обсяг дисертаційної роботи. Текст дисертаційної роботи викладений на 168 сторінках комп'ютерного тексту і сформований з анотацій, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу і узагальнення одержаних результатів, висновків, списку використаних джерел і додатків. Робота містить 40 таблиць, 5 рисунків. Бібліографічний список налічує 290 джерел, з них 263 латиницею.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Репродуктивна здатність баранів залежно від чинників довкілля.

Вівці належать до тварин, статеву активність яких залежить від сезонних змін, а її пік збігається з періодом скорочення світлового дня. Єдиним гормональним фактором, що визначає парувальний сезон і період статевого спокою, є мелатонін, який синтезується шишкоподібною залозою лише вночі. Із продовженням світлового дня секреція мелатоніну зменшується, що викликає зниження активності гонад, а коли тривалість світлового дня скорочується, тоді завдяки збільшенню секреції мелатоніну, підвищується статеву активність. Мелатонін у самок стимулює гіпоталамус до секреції гонадотропін-рилізінг гормону, який, своєю чергою, впливає на гіпофіз і виділення ФСГ і ЛГ, а у самців — початок сперматогенезу і продукування тестостерону. Отже, світло вважається основним чинником стимуляції статевої функції у тварин, а у баранів воно сповільнює сперматогенез [19–22].

Процес сперматогенезу у самців сільськогосподарських тварин проходить безперервно. Численними дослідженнями доведено, що сезонні і метеорологічні чинники можуть впливати на статеву активність, інтенсивність сперматогенезу, кількісні і якісні показники еякулятів [23–29].

G. H. Moghaddam et al. (2012) встановили, що у баранів всіх порід сперматогенез і секреція статевих гормонів відбувається безперервно, що дозволяє використовувати їх для парування впродовж цілого року [30]. Проте, сезонні екологічні чинники можуть суттєво впливати на статеву активність баранів, кількісні і якісні показники сперми. Ця залежність чіткіше проявляється в умовах пасовищного утримання, тобто при безпосередньому і тривалому контакті організму тварин з природними чинниками зовнішнього середовища [19, 29, 31, 32].

Натомість, інші автори повідомляють, що барани-плідники більшості порід в Україні впродовж року проявляють нормальні статеві функції і продукують сперму, хоча найвища статеву активність у них спостерігається

восени. Якість сперми баранів, на думку авторів, більше залежить від їх годівлі, догляду, утримання та режиму племінного використання, ніж від пори року [33].

Дослідженням кількісних і якісних показників сперми при одержанні і кріоконсервуванні у різні сезони року від баранів-плідників порід асканійської тонкорунної, кавказької, каракульського асканійського багатоплідного типу, асканійських кросбредів, австралійського мериноса встановлено, що за однакового рівня годівлі, умов утримання і експлуатації плідники мають різні величини досліджуваних показників, що вказує на їх породні особливості. За якістю сперма від цих баранів була придатна для кріоконсервування і штучного осіменіння овець [23].

За даними A. Casao et al. (2010) у деяких іспанських порід овець спостерігали високий прояв сезонності репродуктивної функції, яка регулюється тривалістю світлового дня і секрецією мелатоніну [34]. Зміни світлового дня впливали на якість сперми та показники гормонального профілю, а також на систему антиоксидантного захисту. Про роль мелатоніну в сезонній регуляції синтезу пролактину та зростання мелатоніну за зменшення світлового дня вказують результати інших досліджень [35–38].

Досліджуючи вплив сезону року на якісні параметри сперми баранів та її бактеріальну забрудненість, O. I. Azawi, M. A. Ismaeel (2012) встановили, що у серпні і березні був більший об'єм еякуляту, а найвища концентрація спермійв була наприкінці літа і на початку осені, тобто в парувальний сезон. Водночас, активність і відсоток живих спермійв були вищими у весняно-літній період, а найбільший відсоток спермійв з пошкодженою акросомою зафіксований у зимовий період (грудень – січень). Найвищий показник мікробної контамінації спермійв був у липні, а найнижчий — у січні [39].

A. G. D'Alessandro і G. Martemucci (2003) з'ясовували вплив сезонних коливань на якість кріоконсервованої сперми баранів і встановили, що спермії, заморожені у парувальний сезон (кінець літа – осінь), мали вищу рухливість, виживаність та значно нижчий відсоток пошкодження акросом [40].

Досліджуючи вплив сезону року на кількісні показники еякуляту баранів-плідників та морфологію спермійв J. I. Martia et al. (2012) виявили суттєві розбіжності морфометричних показників спермійв: у парувальний період концентрація, рухливість, а також цілісність мембран спермійв були вищими [41].

Крім вказаних вище чинників зовнішнього середовища, важливий вплив на спермопродуктивність баранів має вік та годівля. Одноманітна годівля, зазвичай, завжди неповноцінна і призводить до зниження репродуктивної функції тварин, оскільки процеси відтворення тварин безпосередньо залежать від біологічно повноцінного живлення [42, 43].

Багатьма дослідниками експериментально доведено, що підвищення повноцінності раціону значно покращує кількісні та якісні показники сперми плідників [44–47]. Доведено, що забезпечення повноцінної годівлі тварин неможливе без застосування комплексу біологічно активних речовин. Ця обставина зумовила прискорений розвиток виробництва вітамінів, амінокислот, макро- і мікроелементів, гормонів та інших органічних і неорганічних біокаталізаторів мікробіологічного та хімічного синтезу [48, 49].

Мінеральні речовини відіграють важливу роль у життєдіяльності організму тварин. Хоча вони і не мають поживної цінності, проте є необхідними компонентами для нормального перебігу фізіологічних процесів в організмі. Зокрема, мікроелементи, Ферум, Купрум, Цинк, Кобальт, Марганець, Йод та інші, входять до складу ензимів, вітамінів, гормонів та інших біологічно активних речовин, роль яких у метаболізмі речовин надзвичайно велика.

Дослідженнями вчених встановлено позитивний вплив окремих мікроелементів (Купрум, Цинк, Селен, Магній, Кобальт, Йод, Молібден) на стан здоров'я тварин, обмін речовин, відтворну функцію овець та спермопродуктивність баранів-плідників [50–52].

Значення вітамінів у годівлі тварин надзвичайно важливе, оскільки всі сторони життєдіяльності організму пов'язані з їх впливом на обмін речовин. Вітаміни входять до складу клітинних утворень і слугують активаторами усіх

синтетичних процесів. Вони біологічно активні і регулюють білковий, ліпідний, вуглеводний і мінеральний обмін, чинять вплив на окисно-відновні процеси і за своєю загальною дією наближаються до гормонів. Про позитивний вплив вітамінів на спермопродуктивність плідників, зокрема баранів-плідників, свідчать дані багатьох дослідників [53–56].

1.2. Роль вітамінів А, D, Е, С та мікроелементів Zn, Mn і Cu у репродукції самців.

Жиророзчинні вітаміни А, D₃ та Е у фізіологічному співвідношенні забезпечують комплексну дію на організм тварин: нормалізують обмін речовин, а також стимулюють репродуктивну здатність. Водночас, вітаміни А, Е і С володіють потужними антиоксидантними властивостями.

Експериментально встановлено, що нестача вітаміну А в кормах та організмі чинить негативний вплив на репродуктивну функцію тварин. За довготривалого дефіциту каротину спостерігають суттєве зниження функції розмноження тварин. Зокрема, дослідженнями підтверджено, що однією з причин виникнення гіпофункції родів є нестача каротину – провітаміну А [57, 58].

Дефіцит вітаміну А у сім'яниках призводить до дистрофії та зменшення їх маси, кількості звивистих каналців, викликає десквамацію епітеліальних клітин та морфологічні аномалії спермійів, а також суттєве зниження кількості клітин Лейдіга [59]. Експериментально доведено, що рівень забезпечення організму тварин каротином значно впливає на ріст, розвиток та функцію органів розмноження [60–62].

Основною складовою вітаміну А є ретиноїди, які попадають в організм тварин в основному з кормами тваринного походження [63, 64]. Ретиноїди володіють вираженими антиоксидантними властивостями, інтенсивність яких регулюється забезпеченням організму Ферумом, Цинком і Магнієм. Це визначає необхідність балансування раціонів годівлі тварин усіма цими елементами [65]. В організмі тварин нестача ретиноїдів супроводжується дефіцитом каротиноїдів, оскільки за умов дефіциту одна з цих сполук може

функціонально замінювати іншу [66, 67]. У молочному скотарстві для підтримання молочної продуктивності на високому рівні на фоні задовільної репродуктивної функції корів необхідно чітко нормувати раціони годівлі за вмістом каротину та Цинку. Це пов'язано з тим, що Цинк каталізує трансформацію каротину корму у вітамін А в організмі тварин [68].

Вітамін А та його метаболіти відіграють важливу роль у репродуктивній здатності барана, зокрема, посилюють сперматогенез, якість сперми лібідо та стимулюють секрецію тестостерону [69–71].

Вітамін А важливий для виживання сперміїв у чоловічому статевому тракті та цілісності сперми [72]. Навіть за короткочасного дефіциту вітаміну А встановлено збільшення вмісту аномальної сперми як у бугаїв, так і у баранів. Встановлено, що вітамін А транспортується через сегменти придатків сім'яників і підвищує дозрівання сперміїв і їх виживаність [73]. Зниження концентрації вітаміну А на рівні епітелію епідидимісу знижує синтез білків трансферину та кластерину, необхідних для дозрівання сперміїв. Збільшення аномалій сперміїв (зокрема аномалій головки) може бути наслідком погіршення транскрипції ДНК сперми. Amann et al. (1993) повідомили, що виділення епідидимісу відіграють життєво важливу роль у захисті плазматичної мембрани сперми, ДНК і хроматину та підвищують ефективність використання енергії [74]. Таким чином, деякі аномалії, такі як аномалії хвоста, можуть бути результатом невідповідних секретів придатків сім'яників. Доведено, що важливим критерієм чоловічої фертильності є кількість нормальних живих і активних сперміїв, які транспортуються через жіночі статеві органи [75]. Інші властивості сперми погіршувалися в різний час після дефіциту вітаміну А в організмі та раціоні. Ймовірно, пряма дія вітаміну А на спермії [76] і на функцію клітин Сертолі [77] може викликати зміни у відсотку аномальних статевих клітин.

Неферментативні антиоксиданти є другим типом синтетичних антиоксидантів або дієтичних добавок, таких як вітаміни (вітамін Е, вітамін С) і мінерали (цинк), а також амінокислоти (глутатіон, гіпотаурин і таурин) [78].

Антиоксиданти, такі як вітамін Е, були запропоновані як антиоксиданти, що розривають основний ланцюг, оскільки вони здатні негайно зменшувати кількість вільних радикалів, таких як пероксил і алкоксил, які утворюються LPO, викликаним аскорбатом заліза [79].

Вітамін С, як правило, розподіляється через тканини у всіх видів тварин, які здатні синтезувати аскорбінову кислоту або отримувати її з їжі. Жуйні тварини та деякі інші види здатні ендогенно виробляти аскорбінову кислоту під дією кишкової флори, тому Національна дослідницька рада не опублікувала жодних рекомендованих харчових вимог. У індиків, однак, добавка 150 мг/кг покращила об'єм сперми на 31% на еякулят. Цей результат можна пояснити здатністю вітаміну С стимулювати активність яєчок через його роль у синтезі стероїдних гормонів [80]. Також було встановлено, що вітамін С функціонує як оборотний окислювач, здатний відновлювати інші молекули [81]. Вітамін С вважається найвагомішим антиоксидантом у позаклітинних рідинах і має здатність зменшувати потенційно шкідливі пероксильні радикали до того, як вони зможуть ініціювати процес перекисного окислення ліпідів у клітинній мембрані [82].

Вітамін С має здатність захищати клітини і тканини в організмі від окислювального пошкодження АФК, зменшуючи циркулюючі глюкокортикоїди [83]. Також вітамін С здатний зменшувати вільні радикали токоферилу, таким чином відновлюючи антиоксидантний токоферол [84].

Концентрація вітаміну С у сім'яній рідині в десять разів вища, ніж у сироватці крові [85, 86]. Зниження рівня викликало неспецифічну аглютинацію сперміїв, що підтверджує позитивний ефект вітаміну С у захисті сперми від окислювального стресу [87]. Аскорбінова кислота (вітамін С) є антиоксидантною речовиною, яка міститься в сім'яній плазмі та епідидимальній рідині як захисний вітамін у придатку сім'яника і може відігравати важливу роль у захисті від пошкодження АФК сперми у багатьох видів тварин, включаючи барана [88].

Вітамін С також підтримує сперматогенез завдяки своїй здатності підтримувати активний стан антиоксиданту. GSH-залежна дегідроаскорбатредуктаза, виявлена у високих концентраціях в сім'яниках підтримує вітамін С у відновленому стані. Встановлено, що вітамін С покращує рухливість спермій і покращує якість сперми та фертильність у щурів [85]. Вітамін С забезпечує близько 65 % антиоксидантних сполук плазми сперми у фертильних чоловіків [89]. Було підтверджено, що вітамін С є одним із основних засобів лікування чоловічого безпліддя [86]. Позаклітинні антиоксиданти сперми роблять значний внесок у захист мембрани спермія від окислювального стресу [90].

Відомо, що вітаміни С (аскорбінова кислота або аскорбат) і Е (альфа-токоферол) необхідні для чоловічої репродуктивної функції та сперматогенезу. Вітамін С, крім того, що він необхідний як ферментативний кофактор, також діє як важливий антиоксидант, поглинаючи вільні радикали (наприклад, O_2^- , OH^-) [91].

Вітамін Е є основною жиророзчинною молекулою-антиоксидантом у біологічних системах [92, 93], інгібуючи реакцію перекисного окиснення ліпідів у мембранах [94]. Крім того, описано, що дефіцит вітаміну Е викликає дегенерацію зародкового епітелію [95]. Окрім індивідуальних антиоксидантних властивостей, аскорбат переробляє альфа-токоферол відновленням його токоферильного радикалу, таким чином дозволяючи йому знову функціонувати як поглинач АФК [96].

Додавання антиоксидантів до розріджувачів або циропротектанових середовищ є добре відомим методом покращення життєздатності та рухливості як свіжозбережених, так і кріоконсервованих спермій барана [97–98]. Показано, що обробка сперми аскорбіновою кислотою та альфа-токоферолом *in vitro* зменшує шкідливий вплив АФК на сперму людини [99].

Додавання цих вітамінів *in vivo* також корисне для покращення репродуктивних показників. D. Yue et al. (2010) [100] показали, що барани (*Ovis aries*), яких годували кормом з додаванням вітаміну Е в кінцевій дозі 200 МО на

барана впродовж 12 місяців, покращували характеристики сперми та ендогенну антиоксидантну здатність тканини сім'яників. Водночас, показано, що дорослі жуйні не здатні використовувати перорально введену аскорбінову кислоту для підвищення концентрації в сироватці через метаболізм у рубці [101]. Однак, останні дослідження показали, що багаторазове пероральне введення подрібненого вітаміну С підвищує концентрацію аскорбінової кислоти в плазмі крові овець (*Ovis aries*) [102, 103] і великої рогатої худоби (*Bos taurus*) [104]. Таким чином, згодовування баранам 300 мг/кг вітаміну С з кормом упродовж 4–6 тижнів показало сприятливий вплив на якість сперми [105].

Хоча існує кілька досліджень, які аналізують вплив окремого додавання вітаміну С або вітаміну Е на властивості сперми барана, немає жодних повідомлень про вплив пероральних добавок як вітаміну С, так і Е на параметри сперми барана. У попередніх дослідженнях на вівцях комбіноване лікування показало запобігання окисному стресу [106] та покращення репродуктивних параметрів [107]. Дані щодо чоловіків показують, що підвищення базальних рівнів ендогенних антиоксидантних ферментів, головним чином СОД, у сім'яній плазмі [108] та інших тканинах [109] було позитивно пов'язане з концентрацією спермійів і загальною рухливістю.

E.J. Cofré-Narbona et al. (2016) встановили, що згодовування вітамінів Е і С баранам впродовж 30 діб збільшили об'єм, концентрацію спермійів, загальну та прогресивну рухливість і життєздатність спермійів, а також активність супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази та загальну антиоксидантну здатність у плазмі сперми [110].

Було показано, що глютамін (5 mM) забезпечує кріопротекторний ефект покращенням таких параметрів, як цілісність мембрани, рухливість і дія КАТ у спермі барана після розморожування [111].

Заморожена-розморожена сперма, яка зберігалася в розріджувачі, що містить інозит, мала покращені параметри, такі як рухливість, цілісність акросоми та інтактні морфологічні показники. Інозит діє як молекула з антиоксидантними властивостями, що призводить до більшої антиоксидантної

дії глутатіону [112]. Численні вітаміни, такі як вітамін Е, С, В₁₂, відіграють важливу роль у покращенні якості сперми. Вітамін Е (альфа-токоферол або тролокс) міститься у високій концентрації в мембрані сперми, що робить його основним антиоксидантом [113].

Вітамін Е є ліпофільним і тому відіграє важливу роль у мембрані сперми, захищаючи ПНЖК від перекисного окислення [114]. Різні форми вітаміну Е можуть покращити цілісність сперми за додавання до наповнювача, який використовується для зберігання та збереження сперми барана [115–117].

Вітамін С (аскорбінова кислота) відіграє життєво важливу роль у підтримці цілісності сперми шляхом інгібування окисного пошкодження генетичного матеріалу в спермі [85, 117]. F. Amidi et al. (2016) повідомили, що аскорбінова кислота відіграє роль проокислювача, коли також присутні іони перехідних металів [118]. Амінокислоти, такі як таурин, гіпотаурин, цистеїн, пролін, гліцин, глутамін і гістидин, присутні у високих концентраціях у сім'яній плазмі, де вони відіграють важливу роль як неферментативні «мисливці» з антиоксидантними властивостями.

Додавання кількох антиоксидантів до розріджувача сперми виявилось корисним для збереження рухливості та життєздатності сперміїв шляхом гіпотермічного зберігання сперми різних видів [119, 120]. Рухливість сперми барана і бугая підтримується додаванням суміші супероксиддисмутази (СОД) і каталази (КАТ), глутатіонпероксидази, мелатоніну, КАТ, відновленого глутатіону і СОД [121-123].

R. K. Paul et al. (2017) встановили, що антиоксиданти відіграють важливу роль, очищаючи АФК, що виробляються мертвими сперміями, і, таким чином, уникаючи опосередкованого АФК перекисного окиснення ліпідів плазматичної мембрани сперміїв. Крім того, ліпідно-білкові взаємодії в плазматичній мембрані можуть бути захищені антиоксидантами, які регулюють закріплення білка на ліпідному подвійному шарі, і на неї може впливати перекисне окиснення ліпідів через гіпотермічне збереження сперміїв барана. Антиоксиданти захищають цілісність мембрани сперми, захищаючи гідрофобні

взаємодії в подвійному шарі. Крім того, оскільки білки в подвійному шарі утримуються між ліпідами в основному через гідрофобну взаємодію з ліпідами, захист цих взаємодій антиоксидантами також може підтримувати їхнє прикріплення до подвійного шару[124].

В останнє десятиліття вітамін D з'явився як плейотропна молекула з безліччю аутокринних, паракринних та ендокринних функцій, опосередкованих класичними геномними та некласичними негеномними діями, на численні органи та системи-мішені. Експресія рецептора вітаміну D і ферментів, що метаболізують вітамін D, в чоловічій репродуктивній системі, свідчить про те, що в сім'яниках відбувається синтез і регуляція вітаміну D, а також його функціонування. Роль вітаміну D в модуляції функцій сім'яників, включаючи синтез гормонів і сперматогенез, була досліджена у тварин і людей [125]. Експериментально підтверджено сприятливий вплив вітаміну D на чоловічу фертильність, модулюючи вироблення гормонів за допомогою геномних і негеномних дій, і, зокрема, покращуючи якість сперми, по суті, за рахунок негеномних дій. Однак клінічні дослідження на людях є суперечливими. Дійсно, вітамін D, здається, сприяє модуляції біодоступного, а не загального тестостерону. Крім того, хоча в обсерваційних дослідженнях повідомлялося про підвищену поширеність або ризик дефіциту тестостерону у чоловіків з дефіцитом вітаміну D, більшість інтервенційних досліджень продемонстрували відсутність впливу добавок вітаміну D на циркулюючий рівень тестостерону [126]. Повідомлялося про найбільш стійкий вплив вітаміну D на якість сперми. Зокрема, було показано, що вітамін D позитивно пов'язаний з рухливістю сперміїв і чинить пряму дію на них, включаючи негеномну модуляцію внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу та активацію молекулярних шляхів, що беруть участь у рухливості сперміїв, капацитації та акросомній реакції [127].

Вітамін D є універсальною сигнальною молекулою, яка відіграє роль у регуляції гомеостазу кальцію та здоров'я кісток. В останні роки спектр органів-мішеней вітаміну D розширився, і репродуктивна роль підтверджується

наявністю рецептора вітаміну D (VDR) і ферментів, що метаболізують вітамін D, у статевих залозах, репродуктивному тракті та сперматозоїдах людини. Цікаво, що рівні експресії VDR та ферменту CYP24A1, що інактивує вітамін D, у сперматозоїдах людини служать позитивними прогностичними маркерами якості сперми та є вищими в сперматозоїдах нормальних чоловіків, ніж безплідних чоловіків. VDR опосередковує негеномне підвищення внутрішньоклітинної концентрації кальцію, рухливості сперматозоїдів і індукує акросомну реакцію. Крім того, функціональні дослідження на тваринах показали, що вітамін D важливий для виробництва статевих стероїдів, передачі сигналів естрогену та якості сперми. Перехресні клінічні дослідження підтвердили уявлення про позитивний зв'язок між рівнем 25-гідроксивітаміну D (25-OHD) у сироватці крові та якістю сперми як у фертильних, так і в безплідних чоловіків. Проте ще належить визначити, чи відображає цей зв'язок причинно-наслідковий ефект. VDR повсюдно експресується, а активований вітамін D є регулятором інсуліну, ароматази та остеокальцину. Отже, вірогідно, що вплив вітаміну D на функцію гонад може бути опосередкований через інші ендокринні фактори, регульовані вітаміном D. Нещодавні дослідження показали, що добавки вітаміну D підвищують запліднювальну здатність сперміїв [128].

Zn є другим мікроелементом за кількістю в організмі людини, який повинен надходити з їжею. Його благотворний вплив на репродукцію, особливо у чоловіків, відомий і описаний у багатьох оглядових статтях [129–133].

Важливість Zn для функцій репродуктивних органів підкреслюється тим фактом, що його концентрація в сім'яній плазмі людини вища порівняно з іншими тканинами [134].

Zn є кофактором SOD, ферменту, який є частиною системи антиоксидантного захисту. Антиоксидантні властивості Zn і здатність конкурувати з токсичними металами важливі для захисту сім'яників від чинників стресу. Zn також необхідний для належного функціонування осі гіпоталамус-гіпофіз-гонади. Синтез тестостерону в клітинах Лейдіга і, отже,

рівень тестостерону в сироватці крові залежить від Zn [139, 140], оскільки Zn є кофактором ферменту 5 α -редуктази, що перетворює тестостерон в активний 5 α -дигідротестостерон [135].

Найважливішою роллю Zn у фізіології сперми є його участь у сперматогенезі [136, 137]. Крім того, було показано, що Zn стимулює дієздатність спермійів і акросомну реакцію активацією рецептора епідермального фактора росту та рецептора, пов'язаного з білком G [138, 139]. Zn-індуковані сигнальні шляхи ємності також відповідають за гіперактивну рухливість спермійів [140]. Zn разом з іншими металами, такими як Ca і Mg, забезпечує нормозооспермію, що, у свою чергу, забезпечує кращу якість ембріонів. Zn покращує швидкість запліднення, беручи участь у проникненні спермійів в яйцеклітину для формування зрілої зиготи, а також у період після запліднення. Його сприятливий вплив на репродукцію підтверджується тим фактом, що як сульфат цинку його додають до середовищ, які використовуються для виробництва ембріонів *in vitro* [141-144]. Оскільки Цинк важливий для чоловічої фертильності, його можна вважати маркером у діагностиці чоловічого безпліддя [131].

Zn впливає як на якість, так і на функцію сперми; тому його відсутність знижує шанси на запліднення [141, 145]. Дефіцит Zn пов'язаний із збільшенням апоптозу і, таким чином, зниженням кількості та рухливості спермійів [146].

У дослідженні R. Rodríguez-Díaz et al. (2022) [147] було виявлено значний зв'язок між вищими рівнями цинку та кращою якістю сперми.

Для поліпшення чоловічої фертильності використовують багато дієтичних добавок; однак їхня ефективність спірна. Тим не менш, була підтверджена ефективність добавок Zn щодо збільшення об'єму сперми, рухливості та морфології спермійів [148].

Однак, не всі дослідження підтверджують зв'язок між Zn у плазмі сперми та чоловічою фертильністю. Рідко повідомлялося про несприятливий вплив надлишку Zn на чоловічу фертильність. Однак, деякі звіти свідчать про те, що надлишок Zn може мати негативний вплив на якість сперми [131, 149].

Mn є незамінним компонентом ферментів, які беруть участь в окисно-відновних процесах, тобто СОД, псевдо-КАТ [150]. Mn має антиоксидантні властивості, отже, здатність поглинати вільні пероксидні радикали [151] і інгібувати перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) [152]. Дослідження Cheem et al. [153] у 2009 році підтвердили корисність Mn^{2+} для захисту сперми бугаїв під час кріоконсервації від ПОЛ, спричиненого атакою АФК. Додавання Mn до сперми продемонструвало захисний ефект і покращило якість сперми, тобто відсоток рухливості, відсоток гіпоосмотичного набряку, а також зниження виробництва малонового діальдегіду і витоку білка, з додаванням 150 мкМ і 200 мкМ Mn^{2+} до замороженої сперми. Цей факт може бути використаний для покращення якості сперми/фертильності при екстракорпоральному заплідненні ЕКЗ та штучному заплідненні.

Дефіцит Mn небезпечний для здоров'я. Деякі дослідження показали, що дефіцит Mn викликає репродуктивні порушення [154]. Використання Mn для пригнічення пошкоджень, викликаних окисним стресом (OS), описано в звіті S. Tajaddini et al. (2014) [155]. Їх дослідження проводилися на дорослих мишах, які отримували формальдегід. Хлорид марганцю, введений внутрішньоочеревинно в дозі 5 мг/кг, покращив структуру яєчок і параметри сперми. Слід, однак, підкреслити, що благотворний вплив Mn на фертильність спостерігається за низьких концентрацій, тоді як за вищих концентрацій він є токсичним.

Дослідження на кроликах показали, що навіть одноразова доза 160 мг MnO_2 /кг, введена шляхом інгаляції, викликає дегенеративні зміни в сім'яниках і безпліддя [156].

Дослідження 2003 року повідомило про значне зниження кількості та рухливості сперматозоїдів у мишей, яким перорально застосовували ацетат марганцю протягом 43 днів у дозах 15,0 та 30,0 мг/кг/день [157].

Купрум є мікроелементом, необхідним для здоров'я людини. Однак висока концентрація Cu викликає серйозні проблеми зі здоров'ям.

Повідомлялося, що масовий вплив Cu може призвести до грипоподібного стану, відомого як металева лихоманка [158].

Існує гіпотеза, що Cu бере участь у рухливості спермійів і може також впливати на рецептори гіпофіза, які контролюють вивільнення ЛГ. Cu^{2+} може діяти як конкурентний інгібітор рецепторів ЛГ, ФСГ і тестостерону, пригнічуючи сперматогенез [159].

Низький рівень Cu в сім'яній рідині має місце при азооспермії і посилення при оліго- і астенозооспермії. У дослідженні Y. Li et al. (2014) [160] була виявлена негативна кореляція між значеннями Cu у сім'яній плазмі та нормальною морфологією спермійів. S. A. Mohammed et al. (2014) [161] провели дослідження впливу мідного купоросу на фертильність самців білих щурів-альбіносів. Щурам перорально через шлунковий зонд вводили 1/10 і 1/5 LD50 CuSO_4 . Результати показали зменшення ваги сім'яників і їх придатків, а також значне збільшення аномалій спермійів. Крім того, було виявлено, що тривале введення високої дози Cu^{2+} негативно корелює з рухливістю та життєздатністю спермійів, інтактністю акросоми та гіперактивацією в дослідженні, проведеному на гриветових мавпах (*Chlorocebus aethiops*), ведмежих павіанах (*Papio ursinus*) та макаках-резус (*Macaca mulatta*), використаних як моделі для репродуктивних досліджень [162].

Однак, деякі дослідники не підтверджують існування негативної кореляції між рівнем Купруму в сироватці крові та кількістю або рухливістю гамет [163]. Ці розбіжності можуть бути пов'язані з тим, що концентрація Cu в еякуляті змінюється з часом і навіть відрізняється в різних фракціях того самого еякуляту. Cu сповільнює рухливість спермійів пригніченням окисних процесів і споживання глюкози [164, 165].

1.3. Функціональні, ультраструктурні та біохімічні зміни у сперміях під час кріоконсервування.

Штучне осіменіння прискорює генетичний прогрес, полегшує кріоконсервацію сперми, полегшує транспортування, зменшує потребу в самцях на фермі, дозволяє проводити позасезонне розведення при використанні

технологій синхронізації тічки та забезпечує кращий контроль захворювань [166]. Проте, пошкодження мембрани спермія під час процесу кріоконсервації обмежує використання замороженої та розмороженої сперми овець [167]. Незважаючи на передові та вдосконалені протоколи кріоконсервації, процес заморожування-розморожування робить велику частку деконсервованої сперми нездатною до запліднення ооцита через сублетальне пошкодження, насамперед у формі кріоемності та окисного стресу [168].

У багатьох видів, включаючи овець, атака вільних радикалів на спермії викликає перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) плазматичної мембрани та порушує стабільність ДНК, що, як наслідок, спричиняє втрату функції та цілісності сперми [169, 170].

Як дефіцит захисних ензимів, так і втрата цитоплазми під час сперміогенезу роблять спермії вразливими до окиснення поліненасичених жирних кислот у плазматичній мембрані, що призводить до перекисного пошкодження. Поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК) у мембрані спермія забезпечують плазмолемі гнучкість, необхідну сперміям для участі в поєднанні мембран, пов'язаному із заплідненням [171]. Однак, ці матеріали також чутливі до атаки з боку активних форм кисню (АФК), що призводить до втрати функцій мембрани, пошкодження цілісності клітин і зниження рухливості сперміїв [172, 173]. Від зниження рівня АФК і збільшення виживаності сперміїв до сприяння рухливості, різні антиоксиданти були визнані корисними для захисту чоловічої фертильності [174]. Окислювальний стрес, викликаний АФК, має шкідливий вплив на всі компоненти клітини, такі як ліпіди, білки, цукри та нуклеїнові кислоти [175]. Антиоксиданти — це сполуки, які блокують шкідливий вплив АФК і зменшують окислювальний стрес, таким чином підвищуючи рухливість, життєздатність, здатність і акросомну реакцію сперматозоїдів [176].

Система антиоксидантного захисту в спермі ссавців складається з таких ферментів, як глутатіонпероксидаза (ГПО), супероксиддисмутаза (СОД), глутатіонредуктаза і каталаза (КАТ). Неферментативні антиоксиданти, такі як α -токоферол, аскорбінова кислота та метіонін, також відіграють важливу роль у

захисті клітин від окисного пошкодження [113, 177]. Додатки антиоксидантів, таких як вітамін С, таурин і цистеїн, навіть у малих концентраціях, можуть посилити функцію сперми під час кріоконсервації [178]. Ці типи антиоксидантів мають високу ефективність як поглиначі АФК з високою ефективністю як водорозчинні неферментативні антиоксиданти [179].

Кріоконсервація індукує кріоемність, у якій спермії демонструють ємнісний стан, подібний до того, що спостерігається до запліднення [180]. Ці зміни у властивостях рухливих сперміїв зменшують тривалість життя та здатність замороженої та розмороженої сперми взаємодіяти зі статевим трактом самок і знижують запліднення [181].

Для зниження метаболізму та токсичних побічних продуктів і захисту сперміїв від холодового шоку та осмотичного стресу під час охолодження та транспортування використовують розріджувачі. Розріджувач сперми, який також використовується як середовище для заморожування, діє як кріогенний консервант сперми впродовж тривалого часу, а також збільшує кількість спермодоз з еякуляту [182].

Щоб належним чином захистити спермії під час зберігання сперми, розріджувачі сперми повинні відповідати декільком характеристикам, включаючи відповідну осмоляльність і рН (з достатньою буферною здатністю для підтримки цього), які допомагають зменшити кріогенне пошкодження сперміїв [8]. Розріджувач сперми повинен включати кріопротектор, здатний дифундувати через плазматичну мембрану спермія та мати внутрішньоклітинний ефект (наприклад, диметилсульфоксид, гліцерин або етиленгліколь), непроникний кріопротектор (наприклад, яєчний жовток або молоко), один або кілька цукрів (лактоза, глюкоза, сахароза, рафіноза або трегалоза), буфер (трис), солі (цитрат натрію, лимонна кислота) та антибіотики (стрептоміцин, пеніцилін) [183].

Встановлено, що глюкоза є кращим цукром для використання в середовищі Tris, ніж фруктоза, рафіноза та лактоза [8]. Також доведено, що рухливість і цілісність акросом після розморожування найкраще зберігаються

за допомогою середовища Tris, що містить 2 % яєчного жовтка та з осмолярністю 375 осмоль/кг. Було виявлено, що цей наповнювач дає кращі результати порівняно з наповнювачами середовищ лактоза-жовток і сахароза-лактоза-жовток *in vitro* [184]. Додавання 2 % бичачого сироваткового альбуміну також посилило захист цілісності акросоми. Оптимальних рівнів плідності овець (30–70%) можна досягти, використовуючи сперму, кріоконсервовану в розріджувачі з Tris, для трансцервікального осіменіння [185]. Р. Н. Purdy (2006) повідомив, що розріджувачі на основі Tris, які використовуються для заморожування сперми барана та оленя, зазвичай містять фруктозу або лактозу в менших концентраціях порівняно з іншими середовищами [186].

Холодовий шок викликає зміну селективної проникності мембран спермій для кальцію, що призводить до надмірних внутрішньоклітинних рівнів, які знижують рухливість і функції [187]. Проникність мембрани спермія після охолодження збільшується, і це може бути результатом підвищеної негерметичності мембрани, специфічних білкових каналів і регуляції кальцію, який бере участь у загибелі клітин. Ці зміни під час охолодження стимулюють злиття плазматичної та акросомальної мембран. Холодовий шок зменшує здатність води та розчинених речовин проникати через клітинну мембрану та пошкоджує акросомальні мембрани [186]. Відмінності між видами у чутливості їх спермій до охолодження здебільшого пов'язані зі змінним складом плазматичних мембран. Чутливість плазматичної мембрани до ліпідofазних переходів під час охолодження обернено пропорційна долі присутнього холестерину [188]. Нижчий рівень холестерину присутній у спермі бугая та барана, які вважаються чутливими до охолодження, ніж у спермі кролика та людини, які менш чутливі.

Крім того, ефективність гліцерину як кріопротектора частково пояснюється його здатністю запобігати деяким фазовим переходам під час охолодження підвищенням водопроникності та текучості плазматичних мембран спермій [189]. Р. F. Watson (2000) заявив, що повільне охолодження сперми зі швидкістю 0,5–1°C/хв зменшує навантаження на мембрани спермій, і

це може бути пов'язано зі змінами в ліпідному подвійному шарі та зміненим функціональним станом мембран [190].

Основним місцем пошкодження, викликаного кріоконсервацією, є плазматична мембрана спермія. Завдяки фізіологічній температурі сперми бугая, електронні мікрофотографії тріщин замороження плазматичних мембран головки показують випадковий розподіл мембранних білків [191]. Повідомлялося, що ці ультраструктурні зміни не можна повністю виправити при повторному нагріванні, і кріоконсервована сперма має зменшений розмір головки порівняно з незамороженою спермою, можливо, відображаючи постійну модифікацію архітектури мембрани [192]. Кріоконсервація суттєво впливає на склад і організацію ліпідів плазматичних мембран у спермі барана [193].

Ультраструктурне пошкодження мембран через кріоконсервацію змінює ці елементи, схилиючи спермії до грубих морфологічних дефектів, таких як аномальні акросоми, і може бути причиною низької фертильності кріоконсервованої сперми. Після кріоконсервації спермії, що вижили, містять більше внутрішньоклітинного кальцію, ніж раніше, що відображає порушення механізмів селективної проникності мембран [194]. Підвищений внутрішньоклітинний рівень кальцію в кріоконсервованих сперміях і їхня знижена здатність підтримувати нормальну концентрацію цього катіону також може частково пояснити нижчу фертильність сперми після розморожування [195]. Крім того, G. D. Trinchero et al. (1990) визначили, що заморожена-розморожена сперма легше піддається перекисному окисненню, ніж свіжа сперма. Останні дослідження показують, що кріоконсервація знижує систему антиоксидантного захисту сперми [196].

Якщо процес заморожування відбувається занадто швидко, вода не матиме достатньо часу, щоб покинути клітини через осмос, що призведе до утворення внутрішньоклітинного льоду та постійного пошкодження клітин [197, 113]. Переважно утворення кристалів льоду пов'язане зі змінами осмотичного тиску в незамороженому розчині [198]. Пошкодження сперміїв,

такі як порушення цитоскелета, цитоплазматичний розрив і пошкодження генетичного матеріалу, можуть бути результатом утворення внутрішньоклітинного льоду, осмотичного тиску та охолодження під час кріоконсервації [199].

Встановлено, що ультраструктурне пошкодження мітохондріальної оболонки, аксонем та акросомної мембрани є більшим у сперміях барана порівняно зі сперміями бугая [8]. Морфологічна цілісність заморожено-розморожених спермійв менше збережена, ніж їх рухливість. Біохімічні зміни були показані у формі пошкодження ліпопротеїнів і амінокислот, зниження активності фосфатази, зниження рівня слабкозв'язаного білка холестерину, зниження вмісту калію та підвищення вмісту натрію, зниження активності ферменту гіалуронідази та акрозину, пошкодження простагландинів, зниження синтезу АТФ і АДФ і зниження акросомальної протеолітичної активності [182]. Також встановлено, що чутливість спермійв до холодового шоку різна між видами, причому найбільша чутливість у сперми кнура, висока чутливість у барана, бугая та жеребця; незначна чутливість у собак і котів і найменша чутливість у сперми людини, кролика та півня [190]. Доведено, що вміст середовищ для кріоконсервації знижує хімічний і фізичний стрес, що виникає в результаті охолодження, заморожування та відтавання спермійв [200].

Як правило, у домашніх видів тварин рухливих розморожених спермійв приблизно на 50 % менше, ніж в еквівалентному свіжому зразку; однак доза сперми на одне запліднення різниться між видами. У замороженій та розмороженій спермі барана приблизно 40–60 % клітин рухливі, тоді як лише 20–30 % залишаються біологічно функціональними [201, 202].

У ссавців рекомендується використовувати велику кількість спермійв для осіменіння, щоб подолати зниження фертильності внаслідок процесу кріоконсервації [190]. Показано, що використання замороженої та розмороженої сперми для цервікального штучного осіменіння овець знижує показники фертильності до 21,8 % [202]. У цьому можуть відігравати роль багато чинників, наприклад вплив процесу заморожування-розморожування,

зменшення еквілібрації, зниження життєздатності та ємності сперматозоїдів, ембріональна смертність і управління вівцями, наприклад виявлення тічки та час осіменіння [203, 204]. Через зниження життєздатності та функції живої сперми можна очікувати, що осіменіння кріоконсервованими сперміями призведе до зниження рівня фертильності у домашніх видів тварин [8, 190]. Експериментально доведено, що лапароскопічне осіменіння є кращим методом запліднення замороженою та розмороженою спермою з точки зору показників фертильності порівняно з трансцервікальним або цервікальним штучним осіменінням [203, 205], однак цей метод передбачає використання спеціального та дорогого обладнання та може призвести до зниження добробуту тварин [205, 206].

Процес кріоконсервування має чотири основні впливи на сперму. По-перше, він видаляє покриття позаклітинних компонентів і пов'язане покриття ліпідів і білків з кріопротекторного розріджувача [207]. По-друге, зниження температури призводить до міжфазного розподілу ліпідів і, таким чином, латеральної реорганізації компонентів мембрани [208], а також до зниження цілісності мембрани та акросоми через утворення внутрішньоклітинного льоду, що спричиняє пошкодження мембрани спермія [182]. По-третє, змінюється проникність поверхні спермія для кріопротекторів, води та іонів [209]. І, по-четверте, відбувається ослаблення клітини, що зменшує її здатність протистояти більшому стресу [210].

Через стрес, викликаний заморожуванням, на мембрані сперми стимулюється перекисне окиснення ліпідів. Це дозволяє плазмі сперми повністю взаємодіяти зі спермою перед впливом цервікального слизу [211]. Мембрана спермійв барана має низьке співвідношення холестерину до фосфоліпідів, і це спричиняє її чутливість до холодового шоку та осмотичного стресу [212]. Це пошкодження, яке називається ефектом розведення, спричинене зниженням концентрації сім'яної плазми через надмірне розведення [213]. Цей ефект можна зменшити додаванням сім'яної плазми

через відстрочені зміни в кріоконсервованих сперміїв під час розморожування [214].

Методи збереження сперми барана потребують використання розчинників, оскільки вони мають відповідну осмолярність для захисту сперміїв від кріогенного пошкодження. За допомогою скануючої електронної мікроскопії встановлено шкідливий вплив холодового шоку на мембрану спермія. Це пошкодження частково усувається завдяки захисному ефекту протеїнів сім'яної плазми: інкубування статевих клітин проводили з 0,7 мг білків сім'яної плазми спричинило відновлення поверхні плазматичної мембрани у майже 65 % пошкоджених сперміїв до початкового вигляду. Крім того, інкубування сперміїв, підданих холодовому шоку, з низькомолекулярними протеїнами сім'яної плазми спричинило сприятливий ефект, оскільки фракції білків плазми сперми ліквідували структурні пошкодження, спричинені холодовим шоком, відновлюючи початковий вигляд поверхні плазматичної мембрани сперми [215].

1.4. Застосування наночастинок для підвищення відтворювальної здатності самців.

Застосування нанотехнологій у різних галузях промисловості, медицини та різноманітних споживчих цілях зумовило широке поширення виробів з наноматеріалів. Привабливість цих матеріалів є наслідком їхніх унікальних властивостей, таких як ефект плазмового резонансу, надмалий розмір, велике співвідношення площі поверхні до маси, каталітична активність, здатність до поглинання та висока реакційна здатність [216]. Крім того, доведення матерії до нанорозміру (1–100 нм) дає додаткові переваги у вигляді зменшення витрат матеріалів на виробництво та зменшення кількості утворених відходів. Існує багато фізичних і хімічних процедур, корисних для синтезу наночастинок (НЧ) і біосумісних гібридних матеріалів з різною морфологією (форма, розмір) і властивостями. Проте, сьогодні розробляються методи отримання наночастинок, корисних для конкретних застосувань, наприклад, у медицині чи каталізі. Приклади включають спеціально синтезовані наноматеріали, які

використовуються в медицині для персоналізованої протиракової терапії; системи доставки ліків, такі як квантові точки та рання діагностика [217].

Вплив НЧ на якість сперми вивчається лише з початку 21 століття. Перше дослідження магнетиту НЧ було проведено S. B.-D. Makhluф et al. (2006) [218]. У цьому дослідженні було підтверджено перенесення Fe_3O_4 -NPs, покритих полівініловим спиртом, у сперму бугаїв, а саме в мітохондрії та акросоми. Проте, автори не виявили впливу колоїдного розчину Fe_3O_4 -PVA на рухливість або здатність до запліднення яйцеклітини, тобто на ефективність акросомної реакції.

Однак, деякі НЧ проявляють сприятливий або нетоксичний вплив на сперматогенез. Кілька джерел доводять сприятливий вплив НЧ на параметри сперми (кількість, рухливість, життєздатність і відсоток живих сперміїв). N. M. Kobyliak et al. (2015) [219] повідомили, що НЧ діоксиду церію (CeO_2) знижують рівень окисного стресу в спермі щурів, про що свідчить покращення параметрів сперми та зниження рівня продуктів переокисного окиснення ліпідів у сироватці крові, а також підвищення активності КАТ і СОД. Вищенаведене спостереження було підтверджено дослідженням L. Falchi et al. (2018) [220], у якому описано сприятливий вплив НЧ CeO_2 на кінетичні та морфологічні параметри сперми барана, такі як рухливість і цілісність мембран, а також відсутність генотоксичності. Очевидно, CeO_2 -NPs мають майбутнє в медицині завдяки їхній здатності зберігати кисень і активності поглиначів проти АФК, порівнянній з антиоксидантними ферментами в біологічних системах [221]. Численні звіти описують зниження рівня ROS у тканинах або клітинах після впливу CeO_2 -NPs [222, 223]. Навпаки, деякі автори спостерігали проокислювальний [224] або ефект пошкодження ДНК у клітинах печінки та лейкоцитах [225]. Ймовірно, НЧ CeO_2 можуть проявляти різну активність у репродуктивній системі залежно від фізико-хімічних властивостей, концентрації або тривалості впливу, що пояснює спостережувані розбіжності. У мишей застосування CeO_2 -NP призвело до зниження запліднення та накопичення в зернистих клітинах і плазматичних мембранах сперміїв [226]. У

свою чергу гамети овець добре переносили співінкубацію з НЧ CeO_2 . Зернисті клітини, ймовірно, в цьому випадку інтерналізують цю сполуку очевидно шляхом ендоцитозу [227].

Іншим прикладом є додавання Zn-NP як антиоксиданту до розріджувача сперми голштинських бугаїв [228]. Автори дослідження припустили, що оскільки Zn важливий для розвитку тестикул і сперматогенезу, можна очікувати, що Zn-NPs будуть не тільки токсичними, але можуть бути ефективними для збереження якості сперми під час зберігання. Дослідження дійсно продемонструвало ефективність Zn-NPs у захисті спермій від перекисного окиснення ліпідів, що призводить до пошкодження ДНК, зниження параметрів сперми, експресії генів і дефектної цілісності мембрани. Повідомлялося, що додавання до раціону нано-Se позитивно впливає на якість сперми у цапів [229, 230]. Подібним чином маггемітові НЧ, покриті DMSA [231], не виявили негативного впливу на кінетику зародкових клітин, структуру та функцію сперми.

На відміну від більшості повідомлень про репродуктивну нанотоксичність, Е. Т. Namam et al. (2022) [232] описав використання ZnO-NPs з метою відновлення репродуктивної здатності самців щурів після індукції цисплатину (Cis) стимулюванням сперматогенезу. Дослідження породило надії на вирішення проблеми порушення ініціації сперматогенезу. ZnO-NP використовуються в багатьох продуктах і вважаються безпечними, незважаючи на суперечливі повідомлення про токсичність і несприятливий вплив на здоров'я. Метааналіз, проведений у 2022 році на основі систематичного огляду 76 публікацій, виявив кілька ознак, відповідальних за цитотоксичність після впливу ZnO-NP. За результатами досліджень *in vitro* встановлено, що нанотоксичність строго залежить від дози та розміру НЧ, часу експозиції та типу клітинної лінії [233].

А. Fadl et al. (2022) провели дослідження з покращення характеристик сперми баранів після розморожування за допомогою трьох концентрацій ZnO-NP (0,5, 1,0, 1,5 мг/мл Tris-розріджувача), двічі на тиждень впродовж двох

місяців. Встановлено, що зі збільшенням концентрації ZnO-NPs загальна рухливість спермій після розморожування, прогресивна рухливість, життєздатність, функціональна цілісність мембрани, цілісність акросоми цинк зростали лінійно ($P \leq 0,0001$), але відсоток аномальних спермій зменшився ($P \leq 0,0001$). Усі три додані концентрації ZnO-NP покращили рухливість сперми після розморожування, життєздатність, здатність до запліднення та антиоксидантну здатність, але оптимальною виявилася доза ZnO-NP 1,5 мг/мл. [234].

P. Kielbik et al. (2019) досліджували вплив флуоресцентних наночастинок оксиду цинку, легованих європієм (ZnO: Eu NPs), на параметри сперми, апоптоз клітин та цілісність гемато-тестикулярного бар'єру у мишей [235]. Результати свідчать про те, що наночастинок ZnO: Eu змогли накопичуватися у сім'яниках, не впливаючи на параметри сперми, структуру тканин та цілісність гемато-тестикулярного бар'єру.

Багато авторів проводять дослідження з впливу на якість спермій ссавців металів у вигляді нанорозмірних форм або наночастинок [236-238]. Нещодавно в Україні розроблено нову технологію одержання нанокарбоксилатів макро- і мікроелементів, зокрема наносукцинату та наноцитрату мангану, цинку та купруму [239–241].

Незважаючи на наявність великої кількості даних про вплив окремих металів або металевих НЧ, існує прогалина в оцінці безпеки муьтиметалів як на осі гіпофіз–ядро, так і на спермії. Існує дефіцит таких багатоелементних досліджень. Прикладом є робота [242], у якій досліджували вплив Zn, Al та Cu на самців щурів Вістар. Наскільки нам відомо, немає досліджень, які б оцінювали вплив Multi NP на репродуктивну систему.

1.5. Узагальнення огляду літератури

Аналіз літературних даних свідчить про необхідність та ефективність застосування вітамінів А, D₃, Е та С з метою підвищення репродуктивної здатності тварин і зокрема, овець. Також досліджено вплив цих вітамінів на

відтворювальну здатність самців, у т.ч. баранів, де показано зростання окремих якісних показників сперми. Проте, відсутні дані про використання комбінації цих вітамінів з глюконатом цинку у формі ліпосомальної емульсії на статеву активність та якість сперми баранів.

Огляд літературних джерел свідчить і про те, що заморожування може викликати біохімічні, функціональні та ультраструктурні зміни, які послаблюють спермії та зменшують їх виживання у жіночих репродуктивних шляхах з подальшим зниженням фертильності.

Варто зазначити, що, незважаючи на всі дослідження, рухливість і функціональність сперміїв барана в замороженому та розмороженому стані все ще порушені, і потрібно зробити кроки, щоб покращити цілісність заморожено-розмороженої сперми барана і, як наслідок, покращити показники фертильності.

Аналіз літератури також свідчить про необхідність продовження досліджень, спрямованих на підвищення кількісних і якісних показників спермопродуктивності баранів у період статевого спокою.

Також потребує глибокого дослідження вплив мікроелементів у формі наносполук на кріозахисні властивості сперміїв у процесі глибокого заморожування.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Загальна схема досліджень

Дисертаційна робота виконана на кафедрі акушерства, гінекології та біотехнології відтворення тварин імені Г.В. Зверєвої Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. Експериментальну частину досліджень за темою дисертаційної роботи виконували у період з 2020 по 2022 роки на базі ФОП «Когут Б. М.» Городоцького району Львівської області та Львівського науково-виробничого центру «Західплемресурси».

Проведено дві серії експериментів: 1) з'ясування впливу згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки у період статевго спокою на статеву активність баранів і якісні параметри сперми у процесі кріоконсервування; 2) дослідження якості деконсервованих спермій баранів за додавання наносукцинату і наноцитрату Zn, Mn, Cu до складу середовища для кріоконсервування сперми (рис. 2.1).

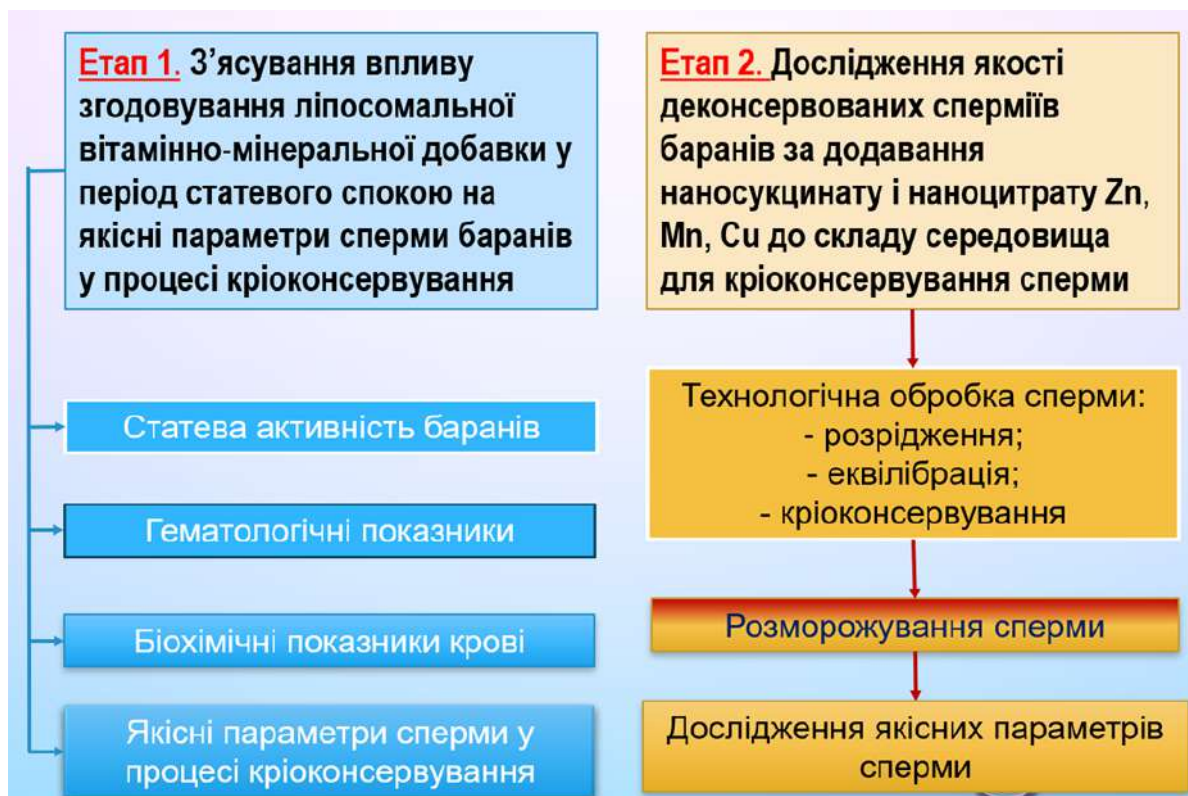


Рисунок 2.1. Загальна схема досліджень

2.2. З'ясування впливу згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки у період статевого спокою на статеву активність баранів і якісні параметри сперми у процесі кріоконсервування.

Першу серію експериментів проводили у ФОП «Когут Б.М» Городоцького району Львівської області, Львівському НВЦ «Західплемресурси» та кафедрі акушерства, гінекології та біотехнології відтворення тварин імені Г.В. Звереві Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.

У ФОП «Когут Б.М» Городоцького району Львівської області було відібрано 12 клінічно здорових баранів породи тексель, віком 2–4 роки, які утримували у чотирьох клітках по три голови у кожній. Перед початком експерименту проводили клінічний огляд кожної тварини з визначенням температури тіла. Температуру визначали ректальним термометром ($N\ 38,5\text{--}40,0^{\circ}\text{C}$). Дослідження проводили у період статевого спокою (березень–травень). Тварини поділили на дві групи: контрольну і дослідну по 6 голів у кожній. Барани контрольної групи отримували основний раціон, до складу якого входили: сіно – 2 кг, силос кукурудзяний – 1 кг, комбікорм – 500 г, у якому три частини вівса, одна частина пшениці та одна частина кукурудзи.

Баранам дослідної групи індивідуально до комбікорму впродовж 45 діб додавали ліпосомальну вітамінно-мінеральну добавку у дозі 2 мл на голову на добу. Для виготовлення 20 мл добавки використали 200 мг цинку глюконату, 250 тис. МО вітаміну А, 25 тис. МО вітаміну D₃, 250 мг вітаміну Е, 500 мг вітаміну С, а також лецитин, твін-20 та деіонізовану воду. Суміш перемішували та диспергували на ультразвуковому диспергаторі УЗДН-1 за частоти 22 кГц впродовж 2–3 хвилин до утворення однорідної емульсії. Отриману емульсію стерилізували на водяній бані впродовж 10 хвилин.

На початку та у кінці згодовування добавки від піддослідних тварин відбирали проби крові з яремної вени до ранішньої годівлі (рис. 2.2). Визначали гематологічні та біохімічні показники, а також концентрацію тестостерону.



Рис. 2.2. Дослідження крові піддослідних баранів

Через 45 діб від початку експерименту, тобто після закінчення згодовування добавки тваринам дослідної групи, впродовж трьох тижнів, від баранів отримували еякуляти на штучну вагіну фірми Minitube з режимом використання плідників дуплетна садка два рази на тиждень. У свіжоотриманих еякулятах визначали об'єм, концентрацією сперміїв, загальну кількість сперміїв у еякуляті та їх рухливість (рис. 2.3.). Для розбавлення використовували сперму баранів з рухливістю не нижче 8 балів (80 % рухливих сперміїв) і концентрацією не менше 2,5 млрд/мл. Після оцінювання сперму витримували за кімнатної температури 15 хвилин, потім контрольні зразки одномоментно розбавляли лактозо-жовтково-трис-цитрато-гліцериновим середовищем (ЛЖТЦГС) у відношенні 1:2–1:3, вливаючи середовище у сперму з розрахунком одержати у дозі деконсервованої сперми не менше 60–80 млн. сперміїв з прямолінійно-поступальним рухом.

Лактоза-жовтково-трис-цитратно-гліцеринове середовище готували в два етапи. Спочатку в 100 мл дистильованої води за температури 90°C розчинили 13 г лактози, а після охолодження до 40°C до розчину додали 30 мл яєчного жовтка. Далі суміш ретельно перемішували за допомогою магнітного

змішувача до отримання однорідної суспензії. Потім у 100 мл цієї суспензії розчиняли трис (0,6 г) і лимонну кислоту (0,3 г), а в останню чергу додавали 9 мл гліцерину.

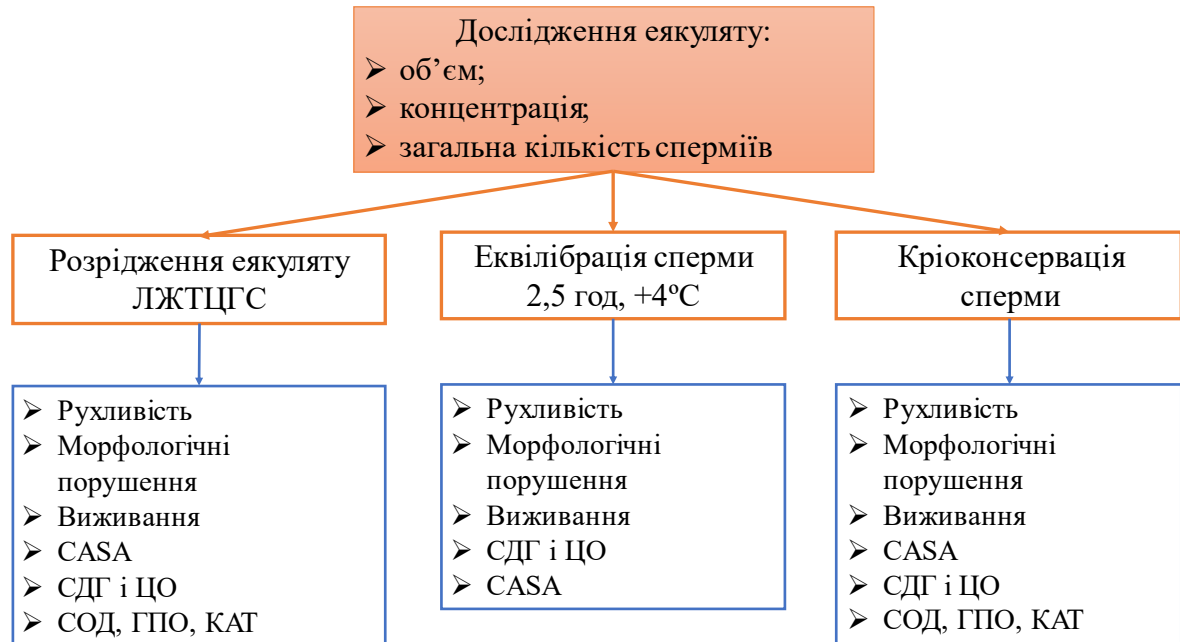


Рис. 2.3. Дослідження якості сперми за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки баранам у період статевго спокою

Розбавлену сперму за допомогою спеціального обладнання німецької фірми «Minitub» фасували у пасти і охолоджували впродовж 2–2,5 годин за температури +2–4°C (еквілібрація). Після цього пасти поміщали в пари азоту на 30 хвилин, потім опускали у рідкий азот. Після заморожування у кожній серії сперми контролювали рухливість спермійв. Для цього розморожували 1–2 пасти у водяній бані за температури 40–42°C. Сперму вважали придатною для зберігання і використання при наявності у ній не менше 40 % спермійв з прямолінійно-поступальним рухом. Сперму, заморожену у пастах, зберігали у алюмінієвих тубах в посудинах Дьюара з рідким азотом.

Після розрідження, еквілібрації та розморожування у спермі визначали рухливість, морфологічні порушення, вживання, кінетичні показники спермійв, активність сукцинатдегідрогенази (СДГ) та цитохромоксидази (ЦО) у

сперміях, а також активність ензимів антиоксидантного захисту супероксиддисмутази (СОД), глутатіонпероксидази (ГПО) і каталази (КАТ).

2.3. Дослідження якості деконсервованих спермій баранів за додавання наносукцинату і наноцитрату Zn, Mn, Cu до складу середовища для кріоконсервування сперми.

Другий етап досліджень проведено на шести клінічно здорових баранах, віком 2–4 роки породи тексель, які утримували у трьох клітках розміром 3 x 4 м по дві голови у кожній.

Сперму від баранів одержували за допомогою штучної вагіни (Minitube, Tiefenbach, Німеччина) і кожний еякулят оцінювали окремо. Від кожного барана-плідника було отримано по 6 еякулятів, всього досліджено 36 еякулятів. Свіжоотримані еякуляти оцінювали за об'ємом (мл), концентрацією спермій (млрд/мл), загальною кількістю спермій у еякуляті (млрд), рухливістю (бали), кількістю спермій з прямолінійно-поступальним рухом (%).

Для розбавлення використовували сперму баранів з рухливістю не нижче 8 балів і концентрацією не менше 2,5 млрд/мл. Після початкової оцінки еякулят витримували за кімнатної температури 15 хвилин, потім одномоментно розбавляли ЛЖТЦГС у відношенні 1:2–1:3, вливаючи середовище у сперму до кінцевої концентрації 8×10^7 /мл спермій з прямолінійно-поступальним рухом.

Для кожного наносукцинату і наноцитрату Zn, Mn і Cu готували по три набори розріджувачів: до ЛЖТЦГС додавали 2,5; 5,0; 7,5 мкг/л Zn, Mn і 1,25; 2,5; 3,75 мкг/л Cu (рис. 2.4.). Підбір доз наносукцинатних комплексів у розріджувачах визначався за вмістом мікроелементів у нативній спермі барана та ефективністю включення карбоксилатних сполук у метаболічні процеси організму тварин. Наносукцинати та наноцитрати, використані в дослідженнях, були отримані за допомогою методу ерозійно-вибухової аквананотехнології ТОВ «Нанотехнології та наноматеріали» (Київ, Україна), як описано раніше Косіновим і Каплуненко (2009)[241].



Рис. 2.4. Дослідження додавання наносполук Zn, Mn і Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів

Розведену сперму завантажували в соломинки об'ємом 0,25 мл (Minitube, Tiefenbach, Німеччина) і охолоджували протягом 2,5 год за температури +4°C. Згодом соломинки поміщали в пари азоту на 30 хвилин, а потім поміщали в рідкий азот. Розморожували соломинки зі спермою на водяній бані за температури 40–42°C протягом 20 с.

У розмороженій спермі вивчали всі фізіолого-біохімічні показники кожної контрольної та дослідної фракцій сперми: рухливість, морфологічні порушення, кінематичні показники та виживаність сперміїв. Також визначали, дихальну та відновну активність у сперміях та фракції протеїнів у них. Для визначення інтенсивності утилізації субстрату та ресинтезу АТФ сперміями в зразках сперми досліджували активність мітохондріальних ензимів: СДГ і ЦО. З метою виявлення стану антиоксидантного захисту в розморожених еякулятах та ефективності мікроелементів у наносукцинатах досліджували активність СОД, ГПО і КАТ.

2.4. Дослідження крові піддослідних баранів

За допомогою автоматичного гематологічного аналізатора Mythic 18 Orphee Vet (Швейцарія) визначали гематологічні показники: WBC – лейкоцити, RBC – еритроцити, HGB – концентрація гемоглобіну в цільній крові, HCT – гематокрит, PLT – тромбоцити; еритроцитарні індекси: MCV – середній об'єм еритроцита, MCH – середній вміст гемоглобіну в окремому еритроциті, MCH – середня концентрація гемоглобіну в еритроцитарній масі.

Лейкограму визначали під мікроскопом у камері Горяєва і підраховували: базофіли, еозинофіли, нейтрофіли, лімфоцити та моноцити в %.

У сироватці крові піддослідних тварин визначали: загальний білок (TPROT), г/л, альбуміни (ALB), г/л, глобуліни (GLOB), г/л, сечовину (urea), ммоль/л, глюкозу (GLU), ммоль/л, холестерол (CHOL), ммоль/л, АЛТ (ALT), од/л, АСТ (AST), од/л, ЛДГ (LDH), од/л. Визначення показників проводили на напівавтоматичному аналізаторі крові «Humalyzer-2000» (Human GmbH, Німеччина). Для біохімічних досліджень використовували реактиви фірми Human (Німеччина).

У плазмі крові піддослідних баранів визначали концентрацію тестостерону імунохемілюмінесцентним методом на автоматичному аналізаторі Stat Fax 2200 компанії Awarines Technology Inc. (США).

2.5. Дослідження сперми баранів-плідників

Об'єм еякуляту барана визначали за допомогою градуйованої пробірки, а концентрацію спермій – спектрофотометрично за допомогою фотометра SDM 6 з сенсорним дисплеєм (Minitube, Tiefenbach, Німеччина).

Рухливість статевих клітин, морфологічні аномалії та відсоток дегенерованих сперматозоїдів визначали за допомогою комп'ютеризованої системи CASA (Computer Assisted Semen Analysis) з активацією модуля Sperm Vision [243]. За допомогою технології CASA визначали кінетичні параметри для кожної статевої клітини: швидкісний середній шлях (VAP), швидкісний

прямий (VSL) і криволінійний швидкість (VCL), мкм/с; прямолінійність (STR), лінійність (LIN) і коливання (WOB), %.

Активність СДГ у сперміях визначали з використанням 2,3,5-трифенілтетразолію і натрію сукцинату (од/0,1 мл× год) та ЦО – використанням реактиву «наді» (од/0,1 мл× год) за методиками, описаними у Довіднику (2012) [244].

Стійкість сперміїв до заморожування визначали у відсотковому відношенні кількості активних рухомих гамет після розморожування, до кількості активних рухомих сперміїв до заморожування після адаптації.

Вживаність деконсервованих сперміїв за температури +38°C визначали під мікроскопом при збільшенні у 200 разів до повної загибелі статевих клітин. Для цього зразки сперми в об'ємі 1мл у скляних флаконах закритих корками поміщали у термостат при температурі +38°C. Вживаність сперміїв визначали в годинах, оцінюючи їх через кожну годину.

Вживаність деконсервованих сперміїв за температури +4°C визначали так: зразки сперми зберігали в холодильнику і щогодини реєстрували кількість живих сперміїв під мікроскопом при 200-кратному збільшенні до повної загибелі статевих клітин.

Активність антиоксидантних ензимів визначали за методами, описаними Wirth і Mijal (2010) [245]. Зокрема, активність СОД визначали за кількістю нітроформазану, що утворюється в реакції між феназинметасульфатом і NADH, за допомогою калібрувальної кривої, для якої використовували стандартний розчин SOD (Sigma, США; C1345) і виражали в МО/мг білка. Поглинання зразків вимірювали спектрофотометрично в кюветі (товщина шару 10 мм) при довжині хвилі $\lambda = 540$ нм (спектрофотометр JENWEY 6300, Кембриджшир, Великобританія). Активність ГПО визначали за допомогою реактиву Елмана (0,01 М розчин 5,5-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти; Acros Organics, Geel, Бельгія); поглинання зразків вимірювали спектрофотометрично в кюветі (товщина шару 10 мм) при довжині хвилі $\lambda = 412$ нм.

Активність КАТ визначали за методикою Корольок та ін. (1991). Поглинання зразків вимірювали спектрофотометрично в кюветі (товщина шару 10 мм) при довжині хвилі $\lambda = 410$ нм.

Інтенсивність поглинання кисню спермою (нг-атом О / 0,1 мл сперми $\times$ хв) визначали полярографічно з використанням електрода Кларка, вмонтованого у термостатовану комірку (38,5°C) об'ємом 1 мл, з автоматичною реєстрацією перебігу процесу, а відновну здатність – теж потенціометрично (mV/хв $\times$ 0,1 мл сперми) за методикою, описаною у Довіднику (2012) [245].

Для виявлення протеїнів каталази проводили електрофорез у 7,5 % поліакриламідному гелі (ПААГ): сперму розбавляли 1:1 Трис-гліциновим буфером та додавали 0,05 мл 40% сахарози. У лунки концентруючого гелю вносили 0,04 мл проби (кінцева концентрація протеїну 100 мкг). Після електрофорезу ПААГ витримували 45 хв в дистильованій воді, насичували 10 хв 0,003 % розчином пероксиду Гідрогену, тричі промивали водою та інкубували за кімнатної температури в темноті 15 хв в середовищі, що містило 1 % розчин ферриціаніду калію (III) та Феруму хлориду. Після фарбування ПААГ місця локалізації протеїнів каталази проявляються яскраво-жовтими смугами на синьо-зеленому фоні. Метод виявлення КАТ дозволяє виявляти до 3×10^{-9} г протеїну в пробі [245].

Усі отримані цифрові дані оброблено за допомогою комп'ютерної програми Statistica з використанням методу варіаційної статистики та програми Excel із пакетів сервісів Microsoft Office 2007 та 2010. Відмінності між групами вважалися статистично значущими при $P < 0,05$.

РОЗДІЛ 3.

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Статева активність та якість сперми баранів у період статевого спокою за додавання ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки до раціону

3.1.1. Гематологічні показники баранів під впливом згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки. Аналізуючи результати гематологічних досліджень перед згодовуванням ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки встановлено, що основні показники в період статевого спокою знаходилися в межах референтних значень ближче до нижньої межі їх фізіологічної норми. Це пояснюється зниженням фізіологічної та статевої активності баранів у період статевого спокою (березень – червень), під час якого годівля тварин спрямована на забезпечення лише фізіологічних потреб.

Оскільки тривалість сперматогенезу у баранів становить 40 діб, нами запропоновано згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки у складі основного раціону впродовж 45 діб з метою посилення статевої активності та якості сперми. Компоненти препарату підібрали, виходячи з їх дії на організм самців, а також на статеву поведінку та сперматогенез.

Дослідженнями встановлено, що під впливом згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки баранам у період статевого спокою зросли гематологічні показники. Зокрема, кількість еритроцитів (RBC) у крові баранів дослідної групи стала вищою на 30,8 % ($P<0,01$), порівняно з контрольними тваринами (табл. 3.1). Аналогічно, концентрація гемоглобіну в крові (HGB) дослідних тварин стала вищою на 33,2 % ($P<0,001$) порівняно з баранами контрольної групи. За вмістом тромбоцитів і гематокритом спостерігали таку ж закономірність. Зокрема, вміст тромбоцитів і гематокрит у крові баранів під впливом згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки вищий, відповідно, на 23,4 % ($P<0,05$) та 13,5 %, порівняно з контрольними тваринами.

Аналогічно, кількість лейкоцитів у крові баранів дослідної групи стала на 34,7 % вищою ($P<0,05$), порівняно з тваринами контрольної групи.

Таблиця 3.1

Гематологічні показники баранів за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Група тварин	
	контрольна	дослідна
Еритроцити, RBC, Т/л	$7,8 \pm 0,27$	$10,2 \pm 0,39^{**}$
Гемоглобін, HGB, г/л	$84,7 \pm 4,60$	$112,8 \pm 5,60^{***}$
Гематокрит, НТС, %	$25,9 \pm 1,76$	$29,4 \pm 1,27$
Середній об'єм еритроцита, MCV, фл	$29,5 \pm 1,60$	$32,4 \pm 1,86$
Середній вміст гемоглобіну в окремому еритроциті, MCH, пг	$10,2 \pm 0,65$	$11,3 \pm 0,47$
Середня концентрація гемоглобіну в еритроцитарній масі, MCHC, г/л	$321,3 \pm 11,92$	$336,5 \pm 13,83$
Тромбоцити, PLT, $\times 10^9$ /мл	$258,0 \pm 7,10$	$318,4 \pm 13,37^*$
Лейкоцити, WRC, $\times 10^9$ /мл	$6,25 \pm 0,39$	$8,42 \pm 0,82^*$

Примітка: у цій і наступних таблицях розділу * – $P<0,05$, ** – $P<0,01$, *** – $P<0,001$ порівняно з контрольною групою.

Аналізуючи еритроцитарні індекси у крові піддослідних тварин, слід відзначити їх вищі значення у баранів дослідної групи. Зокрема, середній об'єм еритроцита (MCV), середній вміст гемоглобіну в окремому еритроциті (MCH) та середня концентрація гемоглобіну в еритроцитарній масі (MCHC) у крові баранів дослідної групи були вищими, відповідно, на 9,8 %, 10,8 та 4,7 % порівняно з тваринами контрольної групи, проте різниці не вірогідні.

Дослідженням лейкоцитарної формули крові піддослідних тварин встановлено відмінності значень між дослідною та контрольною групами. Так, кількість базофілів у крові баранів дослідної групи була більшою на 4,8 % порівняно з контрольними тваринами (табл. 3.2).

Лейкограма баранів за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки, % ($M \pm m$, $n=6$)

Показник		Група тварин	
		контрольна	дослідна
Базофіли		$0,62 \pm 0,03$	$0,65 \pm 0,03$
Еозинофіли		$6,60 \pm 0,41$	$6,45 \pm 0,38$
Нейтрофіли	юні	$0,80 \pm 0,08$	$0,55 \pm 0,06^*$
	паличкоядерні	$4,63 \pm 0,20$	$4,75 \pm 0,14$
	сегментноядерні	$38,50 \pm 1,95$	$39,60 \pm 2,03$
Лімфоцити		$45,20 \pm 1,20$	$43,80 \pm 1,62$
Моноцити		$3,65 \pm 0,12$	$4,20 \pm 0,12^*$

Водночас, кількість еозинофілів у крові баранів дослідної групи була нижчою на 2,2 %, ніж у тварин контрольної групи. За вмістом нейтрофілів спостерігаються наступні розбіжності між групами тварин: відсоток юних нейтрофілів у крові баранів дослідної групи став нижчим на 31,2 % ($P < 0,05$), а за вмістом паличкоядерних і сегментноядерних нейтрофілів навпаки – спостерігали тенденцію до підвищення, відповідно, на 2,4 % і 2,9 %, порівняно з контрольними тваринами.

Кількість лімфоцитів у крові баранів дослідної групи була нижчою на 3,1 %, водночас, вміст моноцитів навпаки був на 15,4 % вищим ($P < 0,05$), порівняно з тваринами контрольної групи.

3.1.2. Біохімічні показники крові баранів за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки. Додавання ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки до раціонів баранів у період статевого спокою суттєво змінило біохімічний профіль крові. Зокрема, вміст загального білка у сироватці крові баранів дослідної групи був на 20,0 % ($P < 0,05$) більшим, ніж у тварин контрольної групи (табл. 3.3).

Біохімічні показники крові баранів за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Група тварин	
	контрольна	дослідна
Загальний білок (TPROT), г/л	59,0 $\pm$ 1,61	70,1 $\pm$ 2,06**
Альбуміни (ALB), г/л	40,2 $\pm$ 0,85	46,3 $\pm$ 2,26*
Глобуліни (GLOB), г/л	59,8 $\pm$ 1,48	53,7 $\pm$ 2,26*
Сечовина (urea), ммоль/л	5,4 $\pm$ 0,26	4,2 $\pm$ 0,19*
Глюкоза (GLU), ммоль/л	2,4 $\pm$ 0,11	3,3 $\pm$ 0,12**
Холестерол (CHOL), ммоль/л	1,1 $\pm$ 0,03	1,4 $\pm$ 0,06**
АЛТ (ALT), од/л	32,3 $\pm$ 1,06	46,5 $\pm$ 1,43**
АСТ (AST), од/л	37,2 $\pm$ 1,43	50,3 $\pm$ 2,08**
ЛДГ (LDH), од/л	235,5 $\pm$ 4,56	223,2 $\pm$ 5,93

Аналізуючи, білковий склад крові, важливо відзначити, що під впливом згодовування вітамінів А, D₃, Е, С та глюконату цинку вміст альбумінів став вищим на 18,4 %. Натомість, вміст глобулінів у крові баранів дослідної групи був нижчим на 12,4 %. Це призвело до збільшення співвідношення альбуміни/глобуліни у крові дослідних тварин на 35,8 % ($P < 0,05$).

Вміст сечовини, як кінцевого продукту розпаду білків в організмі, у крові баранів дослідної групи був нижчим на 22,2 % ($P < 0,05$) порівняно з тваринами контрольної групи. водночас вміст глюкози під впливом згодовування вітамінів А, D₃, Е, С та глюконату цинку став вищим на 37,5 % ($P < 0,05$), що вказує на інтенсифікацію енергетичних процесів в організмі тварин.

Вміст холестеролу у крові баранів дослідної групи під впливом згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки став на 27,3 % вищим, що є позитивним, оскільки холестерол є попередником стероїдних гормонів, які відіграють визначальну роль у репродуктивній функції самців.

Активність ферментів переамінування у крові баранів дослідної групи теж була вищою. Зокрема, активність АЛТ була вищою на 43,9 %, АСТ – на 35,5 % порівняно з контрольними тваринами, хоча різниця між показниками не вірогідна.

За активністю лактатдегідрогенази у крові різниці між групами тварин не встановлено, проте спостерігали тенденцію до зниження цього ензиму у крові дослідних баранів на 5,1 %. Важливо відзначити, що всі біохімічні показники крові баранів знаходилися в межах референтних значень.

Згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки у складі раціонів баранів у період статевого спокою підвищило їх статеву активність. Це підтверджується зростанням концентрації тестостерону у плазмі крові піддослідних тварин. Зокрема, після згодовування добавки концентрація тестостерону у плазмі крові баранів підвищилася на 56,9 % ($P < 0,01$) і становила $9,1 \pm 0,73$ нг/мл (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Концентрація тестостерону у плазмі крові баранів за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки, нг/мл ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Група тварин	
	контрольна	дослідна
Перед згодовуванням препарату	$5,5 \pm 0,28$	$5,2 \pm 0,41$
Після згодовування препарату	$5,8 \pm 0,35$	$9,1 \pm 0,73^{**}$

У тварин контрольної групи концентрація тестостерону у плазмі крові майже не змінилася хоча спостерігалася тенденція до зниження на 5,5%.

3.1.3. Статева активність баранів у період статевого спокою за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки. Експериментально встановлено, що згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки баранам у період статевого спокою активізує їх статеву поведінку, зокрема, статеві рефлексії у процесі отримання сперми. Так, якщо до згодовування розробленої добавки кількість садок баранів для отримання

еякуляту було приблизно однаковим – 1,92 та 1,89 (рис. 3.1), то після додавання до раціону вітамінів А, D₃, Е, С та глюконату цинку кількість садок на еякулят зменшилася на 35,0 % ($P<0,05$).

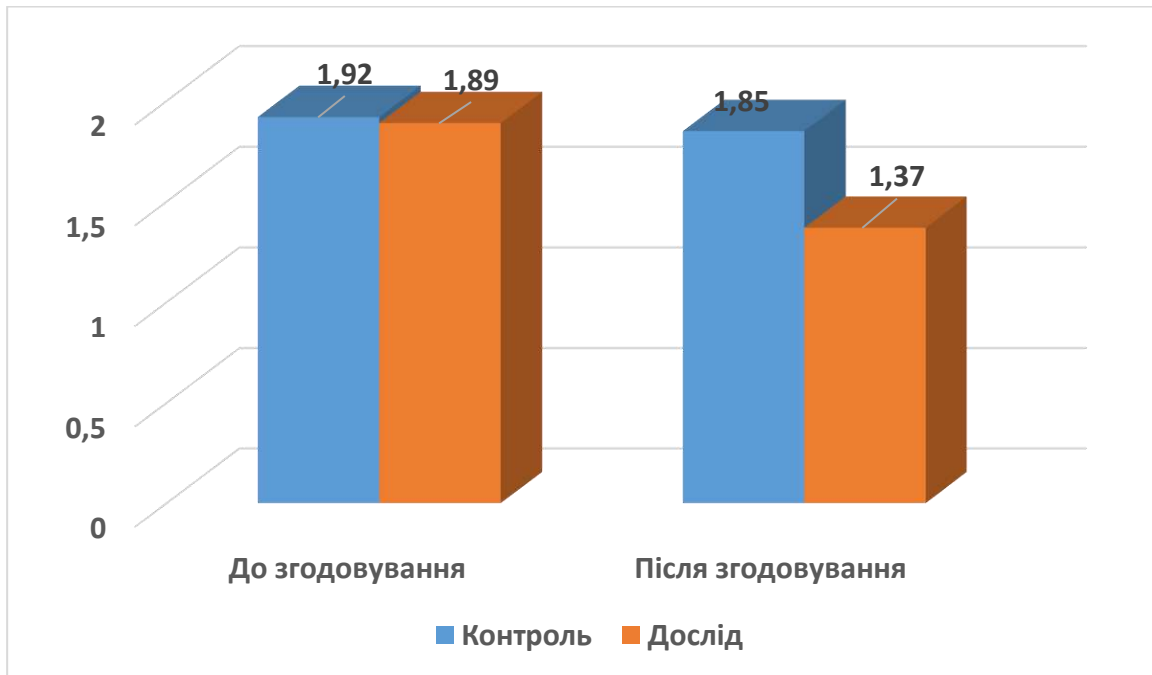


Рис. 3.1. Кількість садок баранів для отримання еякуляту

Це вказує на посилення лібідо у баранів під впливом згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки та підтверджується вірогідним зростанням концентрації тестостерону у крові дослідних плідників.

3.1.4. Якісні параметри сперми баранів після згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки. Дослідженнями встановлено позитивний вплив згодовування баранам ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки на кількісні та якісні показники сперми. Зокрема, об'єм еякуляту у баранів дослідної групи став на 17,6 % більшим ($P<0,05$), ніж у контрольних самців (табл. 3.5).

Аналогічно, концентрація сперміїв та загальна кількість сперміїв в еякуляті баранів дослідної групи відповідно на 8,2 % ($P<0,01$) і 27,4 % ($P<0,05$) вищі, порівняно з тваринами контрольної групи.

Якість еякулятів баранів за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Група тварин	
	контрольна	дослідна
Об'єм еякуляту, мл	$1,08 \pm 0,06$	$1,27 \pm 0,06^*$
Концентрація спермійів, $\times 10^9$ клітин/мл	$3,04 \pm 0,06$	$3,29 \pm 0,06^{**}$
Загальна кількість спермійів, $\times 10^9$ клітин	$3,28 \pm 0,22$	$4,12 \pm 0,23^*$
Життєздатних спермійів (рухливість), %	$85,2 \pm 1,82$	$91,4 \pm 1,34^*$
Спермійів з цитоплазматичними краплями, %	$6,2 \pm 0,30$	$3,9 \pm 0,46^{***}$
Дегенерованих спермійів, %	$8,6 \pm 0,99$	$4,7 \pm 0,55^*$

Згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки збільшило на 6,2 % ($P < 0,05$) відсоток життєздатних спермійів (з прямолінійно поступальним рухом) у період статевих спокую. Водночас, частка спермійів з цитоплазматичними краплями та дегенерованих статевих клітин значно зменшилися – відповідно, на 2,3 % ($P < 0,001$) та 3,9 % ($P < 0,05$).

3.1.4.1. Якість розрідженої сперми баранів після згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки. Дослідженням фізіологічних параметрів розрідженої сперми баранів-плідників встановлено, що активність спермійів баранів після згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки була на 8,4 % вищою ($P < 0,05$) порівняно з контрольними тваринами (табл. 3.6). Значення активності спермійів баранів дослідної групи ($88,2 \pm 2,41$ %) наближається до максимуму і вказує на високу якість еякулятів за впливу вітамінів А, D₃, Е, С та глюконату цинку.

Вживання розріджених спермійів баранів дослідної групи за температури 4°C було вищим на 10,1 % ($P < 0,05$) порівняно з контрольними тваринами і становило $104,0 \pm 4,13$ год. Високий показник виживання спермійів баранів дослідної групи свідчить про підвищену стійкість статевих клітин до умов зовнішнього середовища.

Таблиця 3.6

Активність та виживання нативних спермійв баранів за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Група тварин	
	контрольна	дослідна
Активність спермійв (з ППР), %	$78,3 \pm 2,79$	$86,7 \pm 1,67^*$
Виживання спермійв за 4°C, год	$94,0 \pm 2,27$	$103,5 \pm 1,98^*$

Мікроскопічним дослідженням спермійв баранів з використанням комп'ютерної системи CASA — Sperm Vision встановлено суттєві зміни кінетичних параметрів під впливом тривалого згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки. Зокрема, криволінійне значення швидкості (VCL) спермійв баранів дослідної групи на 11,2 % ($P < 0,05$) більше, ніж у контрольній групі (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

Динамічні показники спермійв (CASA) баранів після розрідження за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Група тварин	
	контрольна	дослідна
VCL, мкм/с	$140,8 \pm 5,94$	$156,5 \pm 3,27^*$
VAP, мкм/с	$65,8 \pm 1,54$	$79,0 \pm 1,97^{***}$
VSL, мкм/с	$57,0 \pm 2,21$	$70,5 \pm 1,48^{**}$
LIN, %	$40,2 \pm 2,63$	$45,1 \pm 1,03$
STR, %	$86,7 \pm 3,13$	$89,4 \pm 2,16$
WOB, %	$47,2 \pm 2,44$	$50,5 \pm 0,53$

Водночас, прямолінійна швидкість (VSL) та середня швидкість (VAP) руху спермійв баранів дослідної групи були, відповідно, на 23,7 % ($P < 0,01$) та 20,1 % ($P < 0,001$) більшими, ніж у контрольній групі. Значно більші значення кінематичних показників спермійв баранів дослідної групи спричинили до

вищих коефіцієнтів їх руху. Так, ступінь лінійності (LIN) та ступінь відхилення (WOB) руху спермій баранів під впливом згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки були вищими, відповідно, на 12,2 % та 7,0 % від контрольних тварин, проте різниці були невірогідними. Аналогічно, ступінь прямолінійності руху спермій баранів дослідної групи (STR) був вищий лише на 3,1 % від показників тварин контрольної групи.

Отже, згодовування баранам ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки баранам призвело до вірогідного підвищення основних кінематичних показників спермій.

Важливе значення в оцінці якості сперми має визначення запліднювальної здатності спермій. У наших дослідженнях активність СДГ у нативних сперміях баранів-плідників після згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки була вищою на 30,1 % ($P < 0,001$) порівняно з контрольними самцями (табл. 3.8).

Таблиця 3.8

Активність СДГ і ЦО у спермі баранів після розрідження за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки, од/0,1 мл× год ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Група тварин	
	контрольна	дослідна
СДГ	$42,7 \pm 2,06$	$53,2 \pm 1,82^{***}$
ЦО	$39,2 \pm 2,32$	$47,8 \pm 2,70^{**}$

Аналогічно, активність ЦО у нативних сперміях дослідних баранів-плідників була вищою на 21,9 % ($P < 0,01$) порівняно з тваринами контрольної групи.

Отже, додавання вітамінів А, D₃, Е, С та глюконату цинку у формі ліпосомальної емульсії до раціону баранів-плідників підвищує активність ензимів СДГ і ЦО – маркерів запліднювальної здатності спермій.

Дослідженням активності ензимів антиоксидантного захисту у сперміях встановлено значні розбіжності між групами тварин. Так, у розрідженій спермі баранів, яким згодовували ліпосомальну вітамінно-мінеральну добавку, активність супероксиддисмутази була нижчою на 16,0 % ($P < 0,05$) порівняно з тваринами контрольної групи (табл. 3.9).

Таблиця 3.9

Активність ензимів антиоксидантного захисту у спермі баранів після розрідження за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Група тварин	
	контрольна	дослідна
СОД, МО/мг білка	$41,80 \pm 1,89$	$35,10 \pm 1,81^*$
ГПО, мкмоль/хв $\times$ мг білка	$0,43 \pm 0,02$	$0,53 \pm 0,02^{**}$
КАТ, мкмоль/хв $\times$ мг білка	$0,28 \pm 0,02$	$0,35 \pm 0,02^{**}$

Натомість активність глутатіонпероксидази та каталази у розрідженій спермі баранів після згодовування вітамінів А, D₃, Е, С та глюконату цинку у формі ліпосомальної емульсії була вірогідно вищою від контролю. Зокрема, у розрідженій спермі баранів дослідної групи активність глутатіонпероксидази була вищою на 23,3 % ($P < 0,01$), активність каталази – на 25,0 % ($P < 0,01$) порівняно з контрольними тваринами. Це вказує на високий рівень природної антиоксидантної здатності сперми баранів дослідної групи за рахунок зменшення руйнування мембран статевих клітин і вихід із них антиоксидантних ензимів.

3.1.4.2. Якість сперми баранів після еквілібрації за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки. У процесі еквілібрації внаслідок витримування сперми баранів за температури 4°C впродовж 2,5 годин спостерігали зміни якісних параметрів сперми. Водночас, виявлено позитивний вплив згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки на якісні параметри сперми баранів під час еквілібрації. Так, активність сперміїв баранів дослідної групи була вищою на 16,0 % ($P < 0,05$) порівняно з контрольною

групою (табл. 3.10). Зростання активності спермійв баранів дослідної групи супроводжувалося значним зниженням – на 42,9 % ($P<0,05$) кількості дегенерованих спермійв.

Таблиця 3.10

Активність та виживання спермійв баранів після еквілібрації за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Група тварин	
	контрольна	дослідна
Активність спермійв (з ППР), %	$73,3 \pm 1,67$	$85,0 \pm 1,83^*$
Дегенеровані спермії, %	$10,5 \pm 0,62$	$6,0 \pm 0,58^*$
Вживання спермійв за 37°C , год	$7,8 \pm 0,36$	$8,9 \pm 0,24^*$

Згодовування вітамінів А, D₃, Е, С та глюконату цинку у формі ліпосомальної емульсії призвело збільшення виживання спермійв за 37°C на 14,1 % ($P<0,05$), що може вказувати на високу життєздатність статевих клітин.

Отже, згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки баранам у період статевого спокою підвищує активність та виживання спермійв на фоні значного зменшення дегенерованих спермійв.

Дослідженням активності ензимів – маркерів запліднювальної здатності спермійв СДГ і ЦО встановлено, що після еквілібрації їх активність у спермі баранів, яким згодовували ліпосомальну вітамінно-мінеральну добавку, є значно вищою, ніж у контрольних тварин. Зокрема, активність сукцинатдегідрогенази у спермі баранів дослідної групи після еквілібрації була вищою на 26,7 % ($P<0,001$), ніж у контрольних тварин (табл. 11).

Аналогічно, активність цитохромоксидази у спермі дослідних баранів після еквілібрації була вищою на 22,8 % ($P<0,01$), ніж у контрольних тварин.

Отже, згодовування вітамінів А, D₃, Е, С та глюконату цинку у формі ліпосомальної емульсії сприяє підвищенню активності ензимів СДГ і ЦО – маркерів запліднювальної здатності спермійв баранів після еквілібрації.

Таблиця 3.11

Активність СДГ і ЦО у спермі баранів після еквілібрації за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки, од/0,1 мл× год (M±m, n=6)

Показник	Група тварин	
	контрольна	дослідна
СДГ	40,5 ± 1,87	51,3 ± 2,09***
ЦО	37,2 ± 2,10	45,7 ± 2,20**

Позитивну дію згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки на рухливість сперміїв баранів після еквілібрації підтверджено дослідженням кінематичних параметрів руху сперміїв за допомогою комп'ютерної системи CASA — Sperm Vision. Зокрема, криволінійна швидкість руху сперміїв баранів дослідної групи більша на 13,2 % ($P<0,01$), ніж у контрольних тварин (табл. 3.12).

Таблиця 3.12

Динамічні показники сперміїв (CASA) баранів після еквілібрації за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки (M±m, n=6)

Показник	Група тварин	
	контрольна	дослідна
VCL, мкм/с	130,0 ± 3,45	147,2 ± 5,79**
VAP, мкм/с	66,8 ± 2,96	76,2 ± 2,57*
VSL, мкм/с	51,7 ± 2,17	63,0 ± 2,13**
LIN, %	39,8 ± 1,57	43,0 ± 1,53
STR, %	77,6 ± 2,69	83,2 ± 3,81
WOB, %	51,5 ± 2,22	52,2 ± 2,69

Таку ж закономірність встановили за показниками прямолінійної швидкості (VSL) та середньої швидкості (VAP) руху сперміїв баранів за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки. Зокрема, VSL і

VAR спермійв баранів дослідної групи були, відповідно, на 21,9 % ($P < 0,01$) та 14,1 % ($P < 0,05$) більшими, ніж у контрольній групі. Вищі значення кінематичних показників спермійв баранів дослідної групи призвели до вищих значень коефіцієнтів їх руху. Так, ступінь лінійності (LIN) та ступінь прямолінійності (STR) руху спермійв баранів під впливом згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки були вищими, відповідно, на 8,0 % та 7,2 % від контрольних тварин, хоча різниці були невірогідними. Водночас, ступінь відхилення руху спермійв баранів дослідної групи (WOB) майже не відрізнявся від показника тварин контрольної групи – він був вищий лише на 1,4 %.

Отже, згодовування баранам ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки баранам спричиняє вірогідне підвищення основних кінематичних показників спермійв після еквілібрації.

3.1.4.3. Якість деконсервованої сперми баранів після згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки. У процесі низькотемпературного заморожування спермії піддаються дії низьких температур, що спричиняє внутрішньоклітинні зміни, хоча застосовані середовища для кріоконсервації запобігають руйнуванню плазматичних мембран. Тому, у процесі заморожування-розморожування частина статевих клітин гине і кількість активних спермійв після деконсервації зменшується. У нашому експерименті активність спермійв баранів, яким згодовували ліпосомальну вітамінно-мінеральну добавку, після розморожування була вищою на 18,4 % ($P < 0,05$) порівняно з активністю контрольної групи (табл. 3.13). Водночас, кількість дегенерованих спермійв у дослідній групі тварин була меншою на 50,0 % ($P < 0,01$). Аналогічно, встановлено зменшення кількості деконсервованих спермійв з ушкодженою акросомою на 25,9 % ($P < 0,05$) у баранів дослідної групи.

Згодовування вітамінів А, D₃, Е, С та глюконату цинку у формі ліпосомальної емульсії спричинило збільшення виживання спермійв за 37°C на 20,6 % ($P < 0,01$), що може свідчити про високу життєздатність статевих клітин.

Показник абсолютного виживання спермій баранів дослідної групи мав на 24,6 % ($P<0,05$) вище значення порівняно з тваринами контрольної групи.

Таблиця 3.13

Активність та виживання спермій баранів після деконсервації за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Група тварин	
	контрольна	дослідна
Активність спермій (з ППР), %	$50,0 \pm 2,89$	$59,2 \pm 2,39^*$
Дегенеровані спермії, %	$15,0 \pm 0,87$	$7,5 \pm 0,44^{**}$
Кількість деконсервованих спермій з ушкодженою акросомою, %	$29,4 \pm 1,15$	$21,8 \pm 1,38^*$
Вживання спермій за 37°C, год	$6,3 \pm 0,21$	$7,6 \pm 0,24^{**}$
Показник абсолютного виживання, ум.од.	$11,4 \pm 0,71$	$14,2 \pm 0,62^*$

Отже, згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки баранам у період статевого спокою підвищує активність та виживання деконсервованих спермій на фоні значного зменшення дегенерованих спермій.

Дослідженням прогнозованої запліднювальної здатності деконсервованих спермій баранів за активністю ензимів-маркерів СДГ і ЦО підтверджено позитивний вплив згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки на неї. Зокрема, активність сукцинатдегідрогенази деконсервованих спермій баранів дослідної групи на 43,1 % ($P<0,01$) вища, ніж у контрольних тварин (табл. 3.14).

Аналогічно, активність цитохромоксидази у спермі дослідних баранів після розморожування була вищою на 36,6 % ($P<0,01$), ніж у контрольних тварин.

Отже, згодовування вітамінів А, D₃, Е, С та глюконату цинку у формі ліпосомальної емульсії спричиняє підвищення активності ензимів СДГ і ЦО у спермі баранів після деконсервації, що вказує на високу запліднювальну здатність спермій.

Таблиця 3.14

Активність СДГ і ЦО у спермі баранів після розморожування за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки, од/0,1 мл× год (M±m, n=6)

Показник	Група тварин	
	контрольна	дослідна
СДГ	33,2 ± 1,56	47,5 ± 2,87**
ЦО	29,8 ± 1,27	40,7 ± 1,49**

Дослідженням кінематичних параметрів руху сперміїв за допомогою комп'ютерної системи CASA — Sperm Vision підтверджено позитивну дію згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки на рухливість сперміїв баранів після розморожування. Так, криволінійна швидкість руху сперміїв баранів дослідної групи більша на 10,3 % ($P<0,01$), ніж у контрольних тварин (табл. 3.15).

Таблиця 3.15

Динамічні показники сперміїв (CASA) баранів після деконсервації за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки (M±m, n=6)

Показник	Група тварин	
	контрольна	дослідна
VCL, мкм/с	134,8 ± 2,70	148,7 ± 3,53**
VAP, мкм/с	68,3 ± 1,94	78,0 ± 2,21**
VSL, мкм/с	54,5 ± 2,72	75,7 ± 2,39*
LIN, %	40,6 ± 2,33	50,9 ± 1,12*
STR, %	79,8 ± 3,69	97,0 ± 0,64*
WOB, %	50,7 ± 1,48	52,5 ± 1,11*

Подібну закономірність встановили за прямолінійною швидкістю (VSL) та середньою швидкістю (VAP) руху сперміїв баранів за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки. Зокрема, VSL і VAP сперміїв

баранів дослідної групи були, відповідно, на 38,9 % ($P<0,05$) та 14,2 % ($P<0,01$) більшими, ніж у контрольній групі. Значно більші значення кінематичних показників спермійв баранів дослідної групи призвели до вищих коефіцієнтів їх руху. Так, ступінь лінійності (LIN) та ступінь прямолінійності (STR) руху спермійв баранів під впливом згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки були вищими, відповідно, на 25,4 % ($P<0,05$) та 21,6 % ($P<0,05$) від контрольних тварин. Водночас, ступінь відхилення руху спермійв баранів дослідної групи (WOB) був вищий лише на 3,6 % від показника тварин контрольної групи.

Отже, згодовування баранам ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки баранам забезпечує вірогідне підвищення основних кінематичних показників спермійв після деконсервації.

Відомо, що ензими антиоксидантного захисту (СОД, ГПО, КАТ) відіграють важливу роль у регуляції окисно-відновного балансу, відповідаючи за підтримку якості замороженої сперми. Це робить визначення їх активності у спермі важливим критерієм оцінки якості деконсервованої сперми. Дослідженням активності ензимів антиоксидантного захисту у спермі піддослідних баранів встановлено значні розбіжності між групами тварин. Так, активність супероксиддисмутази у деконсервованій спермі баранів, яким згодовували ліпосомальну вітамінно-мінеральну добавку, була нижчою на 24,3 % ($P<0,01$) порівняно з тваринами контрольної групи (табл. 3.16).

Таблиця 3.16

Активність ензимів антиоксидантного захисту у спермі баранів після розморожування за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки ($M\pm m$, $n=6$)

Показник	Група тварин	
	контрольна	дослідна
СОД, МО/мг білка	$52,2 \pm 1,13$	$39,5 \pm 1,40^{**}$
ГПО, мкмоль/хв. $\times$ мг білка	$0,69 \pm 0,03$	$0,56 \pm 0,02^*$
КАТ, мкмоль/хв. $\times$ мг білка	$0,49 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,01^{**}$

Аналогічним було зниження активності глутатіонпероксидази та каталази у розмороженій спермі баранів після згодовування вітамінів А, D₃, Е, С та глюконату цинку у формі ліпосомальної емульсії. Зокрема, у деконсервованій спермі баранів дослідної групи активність глутатіонпероксидази була нижчою на 18,8 % ($P < 0,05$), активність каталази – на 26,5 % ($P < 0,01$) порівняно з контрольними тваринами. Це вказує на високий рівень природної антиоксидантної здатності сперми баранів дослідної групи внаслідок зменшення руйнування мембран статевих клітин і вихід із них антиоксидантних ензимів.

Отже, згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки баранам у період статевого спокою значно покращує якісні показники спермій у процесі підготовки до заморожування та кріоконсервації.

3.2. Якісні показники сперми баранів за додавання наносукцинату і наноцитрату Mn, Zn і Cu до середовища для кріоконсервування

У результаті проведених досліджень встановлено зміни якісних параметрів сперми баранів під впливом додавання наносукцинатів та наноцитратів мангану, цинку та купруму до середовища для кріоконсервування. Розглянемо спочатку результати експерименту з використання наносукцинатів вказаних мікроелементів.

3.2.1. Якісні показники сперми баранів за додавання наносукцинату Mn, Zn і Cu до середовища для кріоконсервування. Дослідженням встановлено дозозалежну дію наносукцинату Mn у складі середовища для кріоконсервування сперми баранів на якісні показники деконсервованих сперміїв. Так, за додавання наносукцинату Mn у дозі 2,5 мкг/л активність сперміїв баранів була вищою лише на 3,6 %, порівняно з контролем (табл. 3.17). Водночас, додавання наносукцинату Mn у дозі 5,0 мкг/л підвищило активність сперміїв на 18,8 % ($P < 0,05$) порівняно з контролем. Подальше збільшення дози наносукцинату мангану до 7,5 мкг/л спричинило зниження активності сперміїв баранів, яка знаходилася на рівні контролю.

Відомо, що у процесі кріоконсервування та наступного розморожування сперми проходить пошкодження сперміїв, внаслідок чого у деконсервованій спермі зростає кількість дегенерованих статевих клітин. На підтвердження цього у контрольній групі деконсервованої сперми виявлено 13,2 % дегенерованих сперміїв та 25,3 % сперміїв з ушкодженою акросомою. Додавання до середовища для кріоконсервування наносукцинату Mn у дозі 2,5 мкг/л знизило відсоток дегенерованих сперміїв у розмороженій спермі на 20,5 %, а у дозі 5,0 мкг/л – на 30,4 % ($P < 0,05$) порівняно з контролем. Вища доза наносукцинату мангану знизила відсоток денерованих сперміїв лише на 7,3 %.

Подібні зміни встановлено і за кількістю сперміїв з ушкодженою акросомою у деконсервованій спермі баранів. Додавання до середовища для кріоконсервування сперми баранів 2,5 мкг/л наносукцинату Mn знизило

відсоток спермій з ушкодженою акросомою на 8,3 %. Збільшення дози наносукцинату мангану до 5,0 мкг/л знизило кількість спермій з ушкодженою акросомою на 30,8 % ($P<0,05$). Подальше збільшення дози наносукцинату Mn до 7,5 мкг/л знизило ушкодження акросом лише на 18,2 % ($P<0,05$).

Таблиця 3.17

**Активність та морфологічні порушення спермій баранів за додавання
наносукцинатів мікроелементів, %, $n = 6 \text{ M} \pm m$**

Наносукцинат мікроелемента, доза, мкг/л		Активність спермій (з ППР)	Дегенеровані спермії	Спермії з ушкодженою акросомою
Mn ²⁺	2,5	45,8 ± 1,54	10,5 ± 1,12	23,2 ± 1,72
	5,0	52,5 ± 2,14*	9,2 ± 0,70*	17,5 ± 1,26*
	7,5	45,0 ± 1,83	12,3 ± 0,62	20,7 ± 1,28*
Zn ²⁺	2,5	46,7 ± 2,11	11,0 ± 0,97*	20,2 ± 1,66*
	5,0	54,2 ± 2,39**	8,5 ± 0,74*	16,8 ± 0,95**
	7,5	47,5 ± 1,12	11,2 ± 0,60	21,0 ± 1,46*
Cu ²⁺	1,25	46,7 ± 1,05	12,7 ± 0,80	23,5 ± 1,69
	2,5	39,2 ± 2,39	15,8 ± 1,40	27,5 ± 1,26
	3,75	36,7 ± 2,47***	21,0 ± 1,83**	31,0 ± 1,18**
Контроль		44,2 ± 2,01	13,2 ± 1,01	25,3 ± 1,54

Примітка. У цій і наступних таблицях розділу * – $P<0,05$, ** – $P<0,01$, *** – $P<0,001$ порівняно контролем.

Аналогічні зміни активності та морфологічних порушень спермій баранів встановлено і за додавання наносукцинату цинку до середовища для кріоконсервування. Зокрема, активність спермій за додавання 2,5, 5,0 і 7,5 мкг/л наносукцинату Zn зросла відповідно на 5,7 %, 22,6 % ($P<0,05$) та 7,5 % порівняно з контролем.

Натомість, відсоток спермій з дегенеративних та з ушкодженням акросоми у деконсервованій спермі баранів суттєво знижувалися за додавання

наносукцинату цинку до середовища для кріоконсервування. Так, за додавання 2,5, 5,0 і 7,5 мкг/л наносукцинату Zn відсоток дегенерованих спермій зменшився відповідно на 16,7 %, 35,6 % ($P<0,05$) та 15,2 % порівняно з контролем.

Аналогічно, додавання наносукцинату цинку до середовища для кріоконсервування сперми баранів у дозах 2,5, 5,0 і 7,5 мкг/л знизив відсоток спермій з ушкодженою акросомою відповідно на 20,2 % ($P<0,05$), 33,6 % ($P<0,05$) та 17,0 % порівняно з контролем.

Додавання наносукцинату купруму до середовища для кріоконсервування сперми баранів викликало дещо інші зміни активності та морфологічних порушень спермій (табл. 3.17). Зокрема, із збільшенням дози наносукцинату Cu активність спермій у деконсервованій спермі баранів знижується. Так, за додавання 1,25 мкг/л наносукцинату купруму активність спермій у розмороженій спермі підвищилася на 5,7 %. Подальше підвищення дози наносукцинату Cu до 2,5 та 3,75 мкг/л знизило активність спермій баранів відповідно на 11,3 та 17,0 % ($P<0,01$) порівняно з контролем.

Водночас, із збільшенням дози наносукцинату купруму кількість морфологічних порушень статевих клітин збільшується – за додавання 2,5 і 3,75 мкг/л наносукцинату Cu відсоток дегенерованих спермій у деконсервованій спермі баранів зріс відповідно на 19,7 % та 59,1 % ($P<0,01$) порівняно з контролем. Хоча додавання наносукцинату купруму у найнижчій дозі 1,25 мкг/л призвело до незначного зменшення кількості дегенерованих спермій – на 5,7 % порівняно з контролем. Аналогічно, відсоток спермій з ушкодженням акросоми за додавання 1,25 мкг/л наносукцинату Cu знизився на 7,1 %, а за вищих доз 2,5 і 3,75 мкг/л наносукцинату купруму – навпаки підвищився відповідно на 8,7 та 22,5 % ($P<0,01$) порівняно з контролем.

Отже, додавання наносукцинату Mn і Zn у дозі 5,0 мкг/л до середовища для заморожування сперми баранів вірогідно підвищує активність спермій після деконсервування, а також знижує відсоток спермій з морфологічними порушеннями. Додавання наносукцинату Cu у зростаючих дозах значно знижує

активність спермій у розмороженій спермі баранів, одночасно підвищуючи відсоток дегенеративних спермій.

Мікроскопічним дослідженням спермій комп'ютеризованою системою CASA встановлено зміни кінематичних показників спермій за використання наносукцинатів Mn, Zn і Cu у складі середовища для кріоконсервування сперми баранів. Зокрема, додавання 2,5 мкг/л наносукцинату мангану підвищило швидкість спермія при криволінійному русі (VCL) на 2,0 %, швидкість просування головки спермія по середній траєкторії руху (VAP) – на 14,6 % ($P<0,01$), швидкість прямолінійного руху головки спермія уздовж прямого відрізка між початковою і кінцевою точками траєкторії (VSL) – на 19,3 % ($P<0,01$; табл. 3.18).

Таблиця 3.18

**Динамічні показники деконсервованих спермій (CASA) баранів за
додавання наносукцинату мангану, %, n = 6, M ± m**

Показник	Доза наносукцинату мангану, мкг/л			Контроль
	2,5	5,0	7,5	
VCL, мкм/с	137,5 ± 4,16	152,5 ± 5,94**	141,5 ± 4,40	134,8 ± 3,90
VAP, мкм/с	72,2 ± 2,12**	80,2 ± 2,15**	67,2 ± 1,96	63,0 ± 2,92
VSL, мкм/с	64,2 ± 2,33**	71,7 ± 3,58***	60,2 ± 3,15	53,8 ± 2,15
LIN, %	46,8 ± 1,80	47,1 ± 2,29**	42,6 ± 2,11	39,9 ± 1,11
STR, %	89,1 ± 3,11	89,5 ± 4,30	89,6 ± 4,03	86,0 ± 3,78
WOB, %	52,5 ± 1,02	52,9 ± 2,26	47,9 ± 2,64	47,0 ± 2,54

Збільшення дози наносукцинату Mn до 5,0 мкг/л призвело до найбільшого зростання динамічних показників деконсервованих спермій: VCL – на 13,1 % ($P<0,01$), VAP – на 27,3 % ($P<0,01$) і VSL – на 33,3 % ($P<0,001$) порівняно з контролем. За додавання до середовища для кріоконсервування сперми баранів наносукцинату Mn у найвищій дозі 7,5 мкг/л кінематичні показники деконсервованих спермій зросли несуттєво: VCL – на 5,0 %, VAP – на 6,7 % і VSL – на 11,9 % порівняно з контролем.

Більші значення кінематичних показників спермійв баранів за дії наносукцинату Mn спричинили до вищих коефіцієнтів їх руху, проте абсолютні їх значення не були такими значними. Так, ступінь лінійності (LIN) спермійв баранів за додавання наносукцинату мангану у дозах 2,5, 5,0 та 7,5 мкг/л був вищим від контролю відповідно на 17,3 %, 18,0 ($P<0,01$) та 6,8 %. Ще меншим було зростання ступеня відхилення (WOB) руху деконсервованих спермійв баранів – відповідно на 3,5 %, 4,1 та 4,2 % порівняно з контролем. Ступінь прямолінійності руху спермійв баранів (STR) за додавання 2,5 і 5,0 мкг/л наносукцинату Mn був вищий відповідно на 11,7 і 12,6 % порівняно з контролем, а за дози 7,5 мкг/л – був на рівні контролю.

Подібну закономірність встановлено і при додаванні наносукцинату Zn до середовища для кріоконсервування сперми баранів. Так, додавання 2,5 мкг/л наносукцинату цинку призвело до зростання динамічних показників розморожених спермійв: VCL – на 5,9 %, VAP – на 10,3 % ($P<0,05$) та VSL – на 22,1 % ($P<0,001$) порівняно з контролем (табл. 3.19).

Таблиця 3.19

**Динамічні показники деконсервованих спермійв (CASA) баранів за
додавання наносукцинату цинку, %, n = 6, M ± m**

Показник	Доза наносукцинату цинку, мкг/л			Контроль
	2,5	5,0	7,5	
VCL, мкм/с	142,8 ± 4,50	153,5 ± 5,38**	137,0 ± 5,03	134,8 ± 3,89
VAP, мкм/с	69,5 ± 1,54*	78,5 ± 1,93**	64,5 ± 1,52	63,0 ± 2,92
VSL, мкм/с	65,7 ± 2,16***	70,7 ± 3,61***	56,8 ± 31,16	53,8 ± 2,15
LIN, %	46,4 ± 1,81*	46,1 ± 2,22*	41,9 ± 3,07	39,9 ± 1,11
STR, %	94,5 ± 2,36	90,0 ± 4,17	87,9 ± 3,36	86,0 ± 3,78
WOB, %	46,9 ± 2,54	44,0 ± 2,01	46,7 ± 2,11	47,0 ± 2,54

Найвищі показники зростання кінематичних показників спермійв баранів порівняно з контролем встановлено за додавання 5,0 мкг/л наносукцинату Zn: VCL – на 13,9 % ($P<0,01$), VAP – на 24,6 % ($P<0,01$) та VSL – на 31,4 %

($P < 0,001$). Зі збільшенням дози наносукцинату цинку до 7,5 мкг/л кінетичні показники спермій у деконсервованій спермі баранів знижувалися. Так, значення криволінійної швидкості (VCL) та середньої швидкості (VAP) руху спермій баранів були на рівні контролю, а прямолінійна швидкість (VSL) руху спермій збільшилася лише на 5,6 %. Зростання динамічних показників руху деконсервованих спермій баранів під впливом наносукцинату Zn призвело до збільшення коефіцієнтів рухливості. Зокрема, ступінь лінійності (LIN) спермій баранів за додавання наносукцинату цинку у дозах 2,5, 5,0 та 7,5 мкг/л був вищим від контролю, відповідно, на 16,3 % ($P < 0,05$), 15,5 ($P < 0,05$) та 5,0 %.

Дещо меншим було зростання ступеня прямолінійності руху спермій баранів (STR) – відповідно на 9,9 %, 4,1 та 4,2 % порівняно з контролем. Ступінь відхилення (WOB) руху деконсервованих спермій баранів за додавання 2,5 і 7,5 мкг/л наносукцинату Zn був на рівні контролю, а за дози 5,0 мкг/л – вищий на 6,0 % порівняно з контролем.

Додавання наносукцинату Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів спричинило інші закономірності різниці динамічних показників спермій після розморожування. Зокрема, за додавання 1,25 мкг/л наносукцинату купруму кінематичні показники спермій були на рівні контролю або дещо перевищували його: VCL і VAP були вищими відповідно на 7,0 і 5,2 %, а VSL майже не відрізнявся від контрольного значення (табл. 3.20). Додавання вищих доз наносукцинату Cu призводило до зниження динамічних параметрів спермій баранів після деконсервування. Так, за додавання 2,5 мкг/л наносукцинату купруму показники руху спермій VCL і VAP були на рівні контролю, а прямолінійна швидкість (VSL) руху спермій знизилася на 9,9 % ($P < 0,001$). Подальше збільшення дози наносукцинату Cu до 3,75 мкг/л спричинило вірогідне зниження всіх досліджуваних параметрів руху спермій: VCL, VAP і VSL відповідно на 7,4 %, 16,7 та 21,0 % ($P < 0,05$ – $0,001$).

Зменшення значень кінетичних параметрів деконсервованих спермій за дії наносукцинату Cu призвело до зниження коефіцієнтів рухливості. Так, ступінь лінійності (LIN) спермій баранів за додавання наносукцинату купруму

у дозі 1,25 мкг/л був вищим від контролю на 5,5 %, а у дозах 2,5 та 3,75 мкг/л – нижчим від контролю, відповідно, на 10,3 % ($P<0,05$) та 14,5 % ($P<0,05$).

Таблиця 3.20

**Динамічні показники деконсервованих спермійв (CASA) баранів за
додавання наносукцинату купруму, %, n = 6, M ± m**

Показник	Доза наносукцинату купруму, мкг/л			Контроль
	1,25	2,5	3,75	
VCL, мкм/с	144,2 ± 5,14	136,2 ± 4,79	124,8 ± 3,70*	134,8 ± 3,89
VAP, мкм/с	66,3 ± 1,91	62,0 ± 2,08	52,5 ± 3,04*	63,0 ± 2,92
VSL, мкм/с	54,2 ± 2,33	48,5 ± 2,53***	42,5 ± 2,06***	53,8 ± 2,15
LIN, %	37,7 ± 1,40	35,8 ± 2,06*	34,1 ± 1,77*	34,1 ± 1,76*
STR, %	81,5 ± 1,79	78,3 ± 3,75	81,8 ± 4,55	86,0 ± 3,78
WOB, %	46,2 ± 1,29	45,7 ± 1,52	41,9 ± 1,33	47,0 ± 2,54

Дещо меншим було зниження ступеня прямолінійності руху спермійв баранів (STR) – відповідно на 5,2 %, 9,0 та 4,9 % порівняно з контролем. За ступенем відхилення (WOB) руху деконсервованих спермійв баранів зменшення на 10,9 % спостерігали лише за додавання 7,5 мкг/л наносукцинату Zn, за інших доз різниці між дослідними і контрольною групами були в межах похибки.

Отже, додавання наносукцинату Mn і Zn у дозі 5,0 мкг/л до середовища для заморожування сперми баранів вірогідно підвищує кінематичні показники спермійв VCL, VAP, VSL після деконсервування, збільшуючи водночас коефіцієнти рухливості LIN, STR і WOB. Додавання наносукцинату Cu у зростаючих дозах значно знижує динамічні параметри спермійв у розмороженій спермі баранів, одночасно знижуючи коефіцієнти рухливості.

Важливе значення для оцінки якості сперми має дослідження її виживаності, тобто часу виживання, під час якого активізуються внутрішньоклітинні процеси, забезпечуючи життєздатність спермійв. Додавання наносукцинату Mn до середовища для кріоконсервування сперми баранів у дозах 2,5 і 7,5 мкг/л призвело до незначного зростання виживаності

деконсервованих сперміїв – відповідно на 2,1 та 4,3 % (табл. 3.21). Водночас, додавання 5,0 мкг/л наносукцинату мангану підвищило виживаність сперміїв у розмороженій спермі баранів 8,5 % на ($P<0,01$).

Таблиця 3.21

**Вживаність деконсервованої сперми баранів за додавання
наносукцинатів мікроелементів, год, $n = 6$, $M \pm m$**

Наносукцинат мікроелемента, доза, мкг/л	Mn^{2+}	Zn^{2+}	Cu^{2+}
7,5 / 3,75*	$98,0 \pm 2,58$	$95,3 \pm 2,29$	$62,0 \pm 2,25^{***}$
5,0 / 2,5*	$102,0 \pm 3,18^{**}$	$100,7 \pm 2,76^{**}$	$73,5 \pm 3,52^{***}$
2,5 / 1,25*	$96,0 \pm 1,93$	$96,2 \pm 1,83$	$86,0 \pm 1,93^*$
Контроль	$94,0 \pm 1,88$	$94,0 \pm 1,88$	$94,0 \pm 1,88$

* – дози наносукцинату Cu^{2+}

Аналогічне збільшення часу виживання деконсервованих сперміїв баранів встановили за додавання наносукцинату Zn: за додавання наносукцинату Zn до у дозах 2,5 і 7,5 мкг/л спостерігали незначне зростання виживаності деконсервованих сперміїв – відповідно на 2,1 та 1,0 %. Найбільше зростання виживаності сперміїв встановлено за додавання 5,0 мкг/л наносукцинату Zn до середовища для кріоконсервування сперми – на 7,1 % ($P<0,01$).

За додавання наносукцинату Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів встановлено протилежні зміни виживаності сперміїв – із збільшенням дози зменшується час виживання статевих клітин. Зокрема, додавання 1,25 мкг/л наносукцинату купруму знизило виживаність деконсервованих сперміїв на 8,5 % ($P<0,01$), а за додавання доз 2,5 та 3,75 мкг/л виживаність сперміїв зменшилася відповідно на 21,8 % ($P<0,001$) та 34,0 % ($P<0,001$).

Отже, додавання наносукцинату Mn і Zn у дозі 5,0 мкг/л до середовища для заморожування сперми баранів вірогідно підвищує виживаність спермій, а додавання наносукцинату Cu у зростаючих дозах значно знижує час виживання статевих клітин.

Дослідженням активності ензимів – маркерів запліднювальної здатності спермій СДГ і ЦО встановлено дозозалежні розбіжності у деконсервованій спермі баранів. Так, додавання наносукцинату Mn у дозах 2,5, 5,0 та 7,5 мкг/л до середовища для кріоконсервування сперми баранів підвищило активність СДГ у розморожених сперміях, відповідно, на 27,2 % ($P<0,05$), 50,5 % ($P<0,01$) та 33,4 % ($P<0,05$; табл. 3.22). Дещо менше зростання активності ЦО у деконсервованих сперміях встановлено за додавання наносукцинату Mn у дозах 2,5, 5,0 та 7,5 мкг/л – відповідно на 14,6 %, 22,5 % ($P<0,01$) та 7,9 %.

Таблиця 3.22

Активність СДГ і ЦО у розморожених сперміях баранів за додавання наносукцинатів мікроелементів, $n = 6 \text{ M} \pm m$

Наносукцинат мікроелемента, доза, мкг/л		Активність ензимів, од	
		СДГ	ЦО
Mn ²⁺	2,5	36,5 ± 2,45*	40,7 ± 2,58
	5,0	43,2 ± 2,93**	43,5 ± 1,75**
	7,5	38,3 ± 3,98*	38,3 ± 1,80
Zn ²⁺	2,5	36,7 ± 1,74**	41,8 ± 2,43*
	5,0	47,0 ± 4,22***	43,7 ± 1,89*
	7,5	38,8 ± 3,35*	39,3 ± 1,76
Cu ²⁺	1,25	33,5 ± 2,47*	38,3 ± 2,64
	2,5	26,0 ± 2,02	36,7 ± 2,50
	3,75	21,7 ± 1,59**	29,8 ± 1,94*
Контроль		28,7 ± 2,25	35,5 ± 2,03

Аналогічні результати отримали і за додавання наносукцинату Zn до середовища для кріоконсервування сперми баранів. Так, додавання

наносукцинату цинку у дозах 2,5, 5,0 та 7,5 мкг/л забезпечило підвищення активності СДГ у розморожених сперміях, відповідно, на 27,9 % ($P<0,01$), 63,8 % ($P<0,001$) та 35,2 % ($P<0,05$). Подібне зростання активності ЦО у деконсервованих сперміях встановлено за наносукцинату Zn у дозах 2,5, 5,0 та 7,5 мкг/л – відповідно на 17,7 % ($P<0,05$), 23,1 % ($P<0,05$) та 10,7 %.

Дещо інші зміни активності ензимів – маркерів запліднювальної здатності встановили за додавання наносукцинату Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів. Зокрема, додавання 1,25 мкг/л наносукцинату купруму підвищило активність СДГ і ЦО відповідно на 16,7 % ($P<0,05$) та 7,9 %. Із збільшенням дози наносукцинату Cu до 2,5 та 3,75 мкг/л активність СДГ і ЦО знижується, відповідно, на 9,5 % і 3,4 % та 24,4 % ($P<0,01$) і 16,1 % ($P<0,05$) порівняно з контролем.

Отже, додавання наносукцинату Mn і Zn у дозі 5,0 мкг/л до середовища для заморожування сперми баранів вірогідно підвищує активність сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази у сперміях після деконсервування, а додавання наносукцинату Cu у зростаючих дозах значно знижує активність цих ензимів.

Дослідженням інтенсивності споживання кисню сперміями встановлено зміни дихальної та відновної активності деконсервованої сперми баранів за додавання наносукцинатів Mn, Zn і Cu до середовища для кріоконсервування. Так, додавання наносукцинату мангану у дозах 2,5 та 7,5 мкг/л призвело до незначного зростання дихальної активності сперми баранів – відповідно, на 8,3 і 13,2 % порівняно з контролем (табл. 3.23). Водночас, за додавання 5 мкг/л наносукцинату Mn дихальна активність сперми баранів була максимально вищою від контролю – на 18,0 % ($P<0,05$).

Протилежну закономірність спостерігали за відновною активністю розмороженої сперми баранів під впливом наносукцинату мангану. Зокрема, за додавання наносукцинату Mn спостерігали зниження відновної активності сперми порівняно з контролем: у дозі 2,5 мкг/л – на 15,0 %, 5,0 мкг/л – 30,0 % ($P<0,05$), а у дозі 7,5 мкг/л – на 20,0 %.

**Дихальна і відновна активність розмороженої сперми баранів за додавання
наносукцинатів мікроелементів, $n = 6$, $M \pm m$**

Наносукцинат мікроелемента, доза, мкг/л		Дихальна активність, нг-атом $O_2/0,1$ мл $\times$ хв	Відновна активність, mV/0,1 мл $\times$ хв
Mn^{2+}	2,5	$2,22 \pm 0,15$	$0,17 \pm 0,01$
	5,0	$2,42 \pm 0,17^*$	$0,14 \pm 0,01^*$
	7,5	$2,32 \pm 0,13$	$0,16 \pm 0,01$
Zn^{2+}	2,5	$2,30 \pm 0,14$	$0,16 \pm 0,01^*$
	5,0	$2,58 \pm 0,11^*$	$0,11 \pm 0,01^{**}$
	7,5	$2,15 \pm 0,10$	$0,17 \pm 0,01$
Cu^{2+}	1,25	$2,35 \pm 0,15$	$0,18 \pm 0,01$
	2,5	$2,13 \pm 0,12$	$0,23 \pm 0,02^*$
	3,75	$1,85 \pm 0,17^*$	$0,27 \pm 0,02^*$
Контроль		$2,05 \pm 0,11$	$0,20 \pm 0,01$

Подібну тенденцію щодо змін дихальної та відновної активності деконсервованої сперми баранів встановлено і за додавання наносукцинату Zn до середовища для кріоконсервування. Так, додавання 5,0 мкг/л наносукцинату цинку призвело найбільшого зростання дихальної активності сперми – на 25,9 % ($P < 0,05$) з одночасним зниженням відновної активності на 45,0 % ($P < 0,01$) порівняно до контролю. За додавання наносукцинату Zn у дозах 2,5 та 7,5 мкг/л спостерігали підвищення дихальної активності сперми баранів, відповідно на 12,2 % та 4,9 % і зниження відновної активності відповідно на 20,0 % ($P < 0,05$) та 15,0 %.

За додавання наносукцинату Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів виявлено дещо інші зміни споживання кисню у деконсервованій спермі – зі збільшенням дози дихальна активність знижується, а відновна активність суттєво збільшується. Так, за додавання 1,25 мкг/л наносукцинату купруму дихальна активність сперми баранів була вищою на 15,6 %, а відновна

активність – нижчою на 10,0 %, ніж контрольні значення (табл. 3.23). За додавання 2,5 мкг/л наносукцинату Cu дихальна та відновна активність розмороженої сперми баранів була вищою, відповідно, на 3,9 % та 15,0 % ($P<0,05$), а у дозі 3,75 мкг/л дихальна активність була меншою на 9,8 % ($P<0,05$), а відновна активність більшою на 35,0 % ($P<0,05$), порівняно з контролем.

Отже, додавання наносукцинату Mn і Zn до середовища для кріоконсервування сперми баранів підвищує дихальну та знижує відновну активність розмороженої сперми з найбільшою вірогідністю за дози обох мікроелементів 5,0 мкг/л, що вказує на підвищення активності сперміїв. Додавання ж наносукцинату Cu проявляє протилежну дію на споживання кисню спермою баранів, знижуючи тим самим її якість.

Додавання наносукцинатів Mn Zn і Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів призвело до змін вмісту фракцій розчинних протеїнів у розморожених сперміях. Так, додавання наносукцинату Mn у дозі 2,5 мкг/л збільшило частку альбумінів 1 на 54,8 % ($P<0,01$) з одночасним зменшенням вмісту фракції альбумінів 2 на 25,3 % ($P<0,05$; табл. 3.24). Водночас, вміст фракцій α - і β -глобулінів у деконсервованих сперміях баранів зменшився відповідно на 19,0 % ($P<0,05$) та 7,4 %. Фракції преальбумінів та γ -глобулінів не відрізнялися від контрольних значень. Подібні зміни вмісту фракцій розчинних протеїнів у розморожених сперміях баранів спостерігали за додавання 7,5 мкг/л наносукцинату мангану. Так, вміст фракції альбумінів 1 був більшим на 60,3 % ($P<0,01$), а відсоток преальбумінів та альбумінів 2 не відрізнявся від значень контрольної групи. Вміст β -глобулінів у деконсервованих сперміях баранів зменшився на 44,4 % ($P<0,01$), а фракції α - та γ -глобулінів не відрізнялися від контрольних значень.

Дещо інші зміни фракцій розчинних протеїнів деконсервованих сперміїв баранів спостерігали за додавання наносукцинату Mn у дозі 5,0 мкг/л. Зокрема, відсоток преальбумінів, альбумінів 1 та 2 збільшився порівняно з контролем, відповідно на 15,0 %, 47,9 % ($P<0,01$) та 6,0 %.

**Вміст фракцій розчинних протеїнів у розморожених сперміях баранів за
додавання наносукцинату мангану, n = 6, M ± m**

Фракції протеїнів, %	Дози наносукцинату мангану, мкг/л			Контроль
	2,5	5,0	7,5	
преальбуміни	27,4 ± 3,39	23,2 ± 3,23	27,3 ± 1,44	27,3 ± 1,86
альбуміни 1	11,3 ± 0,7**	10,8 ± 0,95**	11,7 ± 0,92**	7,3 ± 0,63
альбуміни 2	6,2 ± 0,48*	8,8 ± 0,70	8,3 ± 0,85	8,3 ± 0,63
α- глобуліни	3,4 ± 0,24*	2,9 ± 0,25*	4,1 ± 0,17	4,2 ± 0,29
β- глобуліни	2,9 ± 0,18	1,7 ± 0,17**	1,5 ± 0,20**	2,7 ± 0,20
γ- глобуліни	48,9 ± 2,96	52,6 ± 2,00	47,8 ± 2,63	48,4 ± 2,03

Водночас, вміст фракцій α- і β-глобулінів у деконсервованих сперміях баранів був меншим відповідно на 6,0 % та 31,0 % ($P < 0,05$) за одночасного збільшення γ- глобулінів на 8,7 % порівняно з контролем.

Додавання наносукцинату цинку до середовища для кріоконсервування сперми баранів спричинило подібні зміни вмісту фракцій розчинних протеїнів у розморожених сперміях. За додавання 2,5 мкг/л наносукцинату Zn вміст преальбумінів, альбумінів 1 і 2 став більшим, відповідно, на 2,2 %, 60,3 % ($P < 0,01$) та 24,1 % порівняно з контролем (табл. 3.25). Натомість, вміст α-, β- і γ-глобулінів у деконсервованих сперміях баранів був меншим відповідно на 11,1 %, 29,6 % ($P < 0,05$) та 8,1 %. Приблизно такі ж зміни вмісту фракцій розчинних протеїнів у розморожених сперміях баранів спостерігали за додавання 7,5 мкг/л наносукцинату цинку. Так, вміст фракції альбумінів 1 і 2 був більшим, відповідно, на 80,8 % ($P < 0,001$) та 16,9 %, а відсоток преальбумінів не відрізнявся від значення контрольної групи. Вміст α-, β- і γ-глобулінів у деконсервованих сперміях баранів був меншим, відповідно, на 19,0 % ($P < 0,05$), 22,2 % та 9,1 % від контрольних значень.

**Вміст фракцій розчинних протеїнів у розморожених сперміях баранів за
додавання наносукцинату цинку, n = 6, M ± m**

Фракції протеїнів, %	Дози наносукцинату цинку, мкг/л			Контроль
	2,5	5,0	7,5	
преальбуміни	27,9 ± 3,57	23,3 ± 2,66	27,7±3,36	27,3±1,86
альбуміни 1	11,7 ± 0,96**	11,0 ± 0,97**	13,2±1,01** *	7,3±0,63
альбуміни 2	10,3 ± 0,71	9,5 ± 0,76	9,7±0,88	8,3±0,63
α- глобуліни	3,7 ± 0,22	3,1 ± 0,20*	3,4±0,21*	4,2±0,29
β- глобуліни	1,9 ± 0,15*	1,5 ± 0,15**	2,1±0,15	2,7±0,20
γ- глобуліни	44,5 ± 2,86	51,7 ± 1,71	44,0±3,07*	48,4±2,03

Більш різкі зміни фракцій розчинних протеїнів деконсервованих спермій баранів спостерігали за додавання наносукцинату Zn у дозі 5,0 мкг/л. Зокрема, відсоток альбумінів 1 та 2 збільшився порівняно з контролем, відповідно на 50,7 % ($P<0,01$) і 14,5 % за зниження вмісту преальбумінів на 14,7 % порівняно з контролем. Натомість вміст α- і β-глобулінів у деконсервованих сперміях баранів був меншим, відповідно, на 20,2 % ($P<0,05$) та 44,4 % ($P<0,01$), а відсоток γ-глобулінів навпаки – більшим на 6,8 % від контрольних значень.

Додавання наносукцинату Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів теж викликало зміни вмісту фракцій розчинних протеїнів у розморожених сперміях. Зокрема, за додавання 1,25 мкг/л наносукцинату купруму спостерігали збільшення вмісту преальбумінів, альбумінів 1 і 2 відповідно на 9,2 %, 109,6 % ($P<0,01$) та 24,1 % ($P<0,05$) порівняно з контролем (табл. 3.26). Водночас, вміст α-, β- і γ-глобулінів у деконсервованих сперміях баранів був меншим, відповідно, на 26,2 % ($P<0,01$), 11,1 % та 19,1 % ($P<0,01$) від контрольних значень.

Такі ж відмінності за вмістом фракцій розчинних протеїнів у деконсервованих сперміях баранів спостерігали і за додавання наносукцинату Cu у дозах 2,5 та 3,75 мкг/л. Використання дози наносукцинату купруму 2,5 мкг/л спричинило збільшення вмісту преальбумінів на 31,9 %, альбумінів 1 – на 115,1 % ($P<0,01$), альбумінів 2 – на 28,9 % ($P<0,01$) і одночасне зменшення вмісту α -, β - і γ -глобулінів у деконсервованих сперміях баранів, відповідно, на 14,3 %, 48,1 % ($P<0,01$) та 32,4 % ($P<0,05$) порівняно з контролем.

Таблиця 3.26

Вміст фракцій розчинних протеїнів у розморожених сперміях баранів за додавання наносукцинату купруму, $n = 6$, $M \pm m$

Фракції протеїнів, %	Дози наносукцинату купруму, мкг/л			Контроль
	1,25	2,5	3,75	
преальбуміни	$29,8 \pm 3,23$	$31,3 \pm 3,41$	$36,0 \pm 5,13$	$27,3 \pm 1,86$
альбуміни 1	$15,3 \pm 1,61^{**}$	$14,3 \pm 1,76^*$	$15,7 \pm 2,11^{**}$	$7,3 \pm 0,63$
альбуміни 2	$10,3 \pm 1,05^*$	$11,2 \pm 1,08^{**}$	$10,7 \pm 0,88^{**}$	$8,3 \pm 0,63$
α - глобуліни	$3,1 \pm 0,21^{**}$	$3,4 \pm 0,23$	$3,6 \pm 0,32$	$4,2 \pm 0,29$
β - глобуліни	$2,4 \pm 0,17$	$1,9 \pm 0,17^*$	$1,4 \pm 0,17^{**}$	$2,7 \pm 0,20$
γ - глобуліни	$39,0 \pm 3,03^{**}$	$37,8 \pm 2,64^{**}$	$32,7 \pm 3,64^*$	$48,4 \pm 2,03$

Застосування ж дози наносукцинату Cu 3,75 мкг/л призвело до збільшення у деконсервованих сперміях баранів вмісту преальбумінів, альбумінів 1 і 2 відповідно на 14,7 %, 95,9 % ($P<0,05$) та 34,5 % ($P<0,01$) і одночасне зменшення вмісту α -глобулінів на 19,0 %, β - глобулінів – на 29,6 % ($P<0,05$) і γ -глобулінів – на 21,9 % ($P<0,01$) порівняно з контролем.

Отже, додавання наносукцинатів Mn, Zn і Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів викликає суттєві зміни вмісту фракцій розчинних протеїнів у розморожених сперміях, збільшуючи відсоток альбумінів за рахунок зменшення вмісту глобулінів.

Додавання наносукцинатів Mn, Zn і Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів викликає зміни активності ензимів

антиоксидантного захисту у розморожених сперміях. Зокрема, за додавання 2,5 мкг/л наносукцинату Mn знизилася активність СОД на 14,7 % ($P < 0,05$) з одночасним підвищенням активності ГПО на 20,5 % ($P < 0,01$), а КАТ – на 7,7 % порівняно з контролем (табл. 3.27). За додавання наносукцинату мангану у дозі 5,0 мкг/л різниця активності ензимів антиоксидантного захисту у деконсервованих сперміях була найвищою порівняно з контролем: активність СОД знизилася на 26,7 % ($P < 0,01$), а активність ГПО та КАТ зросла, відповідно на 54,5 % ($P < 0,01$) і 48,7 % ($P < 0,01$). Водночас, за додавання 7,5 мкг/л наносукцинату Mn різниця активності ензимів антиоксидантного захисту у розморожених сперміях баранів з контролем була незначною або відсутньою: активність СОД була на рівні контролю, а ГПО і КАТ – вищою відповідно, на 4,5 % і 5,1 %.

Таблиця 3.27

Активність ензимів антиоксидантного захисту у розморожених сперміях баранів за додавання наносукцинату мікроелементів, $n = 6$, $M \pm m$

Наносукцинат мікроелемента, доза, мкг/л		СОД, МО/мг білка	ГПО, мкмоль/хв $\times$ мг білка	КАТ, мкмоль/хв $\times$ мг білка
Mn ²⁺	2,5	44,8 $\pm$ 1,92*	0,53 $\pm$ 0,028**	0,42 $\pm$ 0,031
	5,0	38,5 $\pm$ 1,77**	0,68 $\pm$ 0,043**	0,58 $\pm$ 0,039**
	7,5	52,0 $\pm$ 1,75	0,46 $\pm$ 0,040	0,41 $\pm$ 0,031
Zn ²⁺	2,5	45,7 $\pm$ 1,48*	0,51 $\pm$ 0,024**	0,40 $\pm$ 0,026
	5,0	39,0 $\pm$ 1,71**	0,65 $\pm$ 0,040**	0,56 $\pm$ 0,034**
	7,5	48,8 $\pm$ 2,34	0,48 $\pm$ 0,042	0,39 $\pm$ 0,027
Cu ²⁺	1,25	47,0 $\pm$ 2,37	0,49 $\pm$ 0,032**	0,42 $\pm$ 0,026
	2,5	57,8 $\pm$ 2,93	0,37 $\pm$ 0,028*	0,33 $\pm$ 0,026
	3,75	61,5 $\pm$ 1,73*	0,35 $\pm$ 0,022**	0,29 $\pm$ 0,025*
Контроль		52,5 $\pm$ 2,09	0,44 $\pm$ 0,030	0,39 $\pm$ 0,027

Подібні зміни активності ензимів антиоксидантного захисту у деконсервованих сперміях встановлено і за додавання наносукцинату Zn до середовища для кріоконсервування сперми баранів. Зокрема, за додавання наносукцинату цинку у дозах 2,5, 5,0 та 7,5 мкг/л активність СОД у розморожених сперміях баранів знизилася, відповідно, на 13,0 % ($P<0,05$), 25,7 % ($P<0,01$) і 7,0 %, а активність ГПО навпаки підвищилася відповідно, на 15,9 % ($P<0,01$), 47,7 % ($P<0,01$) і 9,1 %. Водночас, активність КАТ у деконсервованих сперміях баранів значно підвищилася порівняно з контролем за дози наносукцинату Zn 5,0 мкг/л – на 43,6 % ($P<0,01$), а за інших доз не відрізнялася від контролю.

Додавання наносукцинату Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів спричинило протилежні зміни активності ензимів антиоксидантного захисту у деконсервованих сперміях. Так, за додавання 1,25 мкг/л наносукцинату купруму активність СОД знизилася на 10,5 %, а ГПО і КАТ навпаки підвищилася, відповідно, на 11,4 % ($P<0,01$) та 7,7 % порівняно з контролем. Зі збільшенням дози наносукцинату Cu картина кардинально змінюється: за додавання 2,5 мкг/л активність СОД зростає 10,1 %, а активність ГПО і КАТ знижується, відповідно, на 15,9 % ($P<0,05$) та 15,4 %. Ще більшою є різниця активності ензимів антиоксидантного захисту у розморожених сперміях баранів з контролем за дози наносукцинату Cu 3,75 мкг/л: активність СОД вища на 17,1 % ($P<0,05$), активність ГПО і КАТ нижча, відповідно, на 20,5 % ($P<0,01$) і 25,6 % ($P<0,05$).

Отже, за додавання наносукцинатів Mn і Zn до середовища для кріоконсервування сперми баранів інтенсифікується активність ензимів антиоксидантного захисту у розморожених сперміях, що вказує на їх вищу якість за оптимальної дози 0,5 мкг/л. Водночас, додавання наносукцинату Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів у зростаючих дозах підвищує активність СОД та знижує активність ГПО і КАТ, що свідчить про зниження якості сперміїв.

Дослідженням ізозимів каталази (КАТ 1, КАТ 2, КАТ 3) встановлено зміни їх вмісту у деконсервованих сперміях баранів під впливом додавання наносукцинатів Mn, Zn і Cu до середовища для кріоконсервування сперми. Так, додавання 2,5 мкг/л наносукцинату Mn призвело до збільшення у розморожених сперміях баранів вмісту КАТ 1 на 8,1 %, КАТ 2 – на 4,1 % та зменшення вмісту КАТ 3 на 7,9 % порівняно з контролем (табл. 3.28). Різниця вмісту ізозимів каталази у деконсервованих сперміях баранів була ще значнішою за дози наносукцинату мангану 5,0 і 7,5 мкг/л. Зокрема, додавання наносукцинату Mn у дозі 5,0 мкг/л спричинило підвищення вмісту КАТ 1 на 46,8 % ($P<0,01$) з одночасним зниженням відсотка КАТ 2 і КАТ 3, відповідно, на 21,6 % ($P<0,05$) та 20,7 % порівняно з контролем. Аналогічно, за додавання наносукцинату Mn у дозі 7,5 мкг/л вміст КАТ 1 збільшився на 51,6 % ($P<0,01$), а КАТ 2 і КАТ 3, навпаки знизився – відповідно, на 23,3 % ($P<0,05$) та 23,1 % порівняно з контролем.

Таблиця 3.28

Вміст ізозимів каталази у розморожених сперміях баранів за додавання наносукцинату мікроелементів, $n = 6$, $M \pm m$

Наносукцинат мікроелемента, доза, мкг/л		Ізозими каталази, %		
		КАТ 1	КАТ 2	КАТ 3
Mn ²⁺	2,5	33,5 ± 1,78	25,5 ± 2,22	41,0 ± 2,92
	5,0	45,5 ± 2,11**	19,2 ± 1,64*	35,3 ± 3,12
	7,5	47,0 ± 2,96**	18,8 ± 1,20*	34,2 ± 3,01
Zn ²⁺	2,5	39,5 ± 2,19**	23,2 ± 1,87	37,3 ± 2,77*
	5,0	37,3 ± 1,26*	27,5 ± 2,14	35,2 ± 2,63
	7,5	40,7 ± 1,87**	25,2 ± 1,82	34,2 ± 3,30*
Cu ²⁺	1,25	40,5 ± 2,93*	22,8 ± 2,09	36,7 ± 4,32*
	2,5	32,8 ± 1,92	25,2 ± 2,23	42,0 ± 3,49
	3,75	36,2 ± 2,87	26,7 ± 1,56	37,2 ± 4,02
Контроль		31,0 ± 1,90	24,5 ± 1,61	44,5 ± 3,36

За додавання наносукцинату Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів теж встановлено зміни вмісту ізозимів каталази у деконсервованих сперміях, проте не такі виражені. Зокрема, додавання 1,25 мкг/л наносукцинату купруму призвело до збільшення у розморожених сперміях баранів вмісту КАТ 1 на 30,6 % ($P < 0,05$) і зменшення вмісту КАТ 2 та КАТ 3, відповідно на 6,9 % та 17,5 % ($P < 0,05$) порівняно з контролем. За додавання наносукцинату Cu у дозі 2,5 мкг/л підвищився вміст КАТ 1 на 5,8 %, КАТ 2 – на 2,9 %, а КАТ 3 знизився на 5,6 % порівняно з контролем. Водночас, додавання наносукцинату купруму у дозі 3,75 мкг/л призвело до збільшення вмісту КАТ 1 на 16,8 %, КАТ 2 – на 9,0 % з одночасним зменшенням вмісту КАТ 3 на 16,4 % порівняно з контролем.

Отже, додавання наносукцинатів Mn, Zn і Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів призводить до дозозалежних змін вмісту ізозимів каталази (КАТ 1, КАТ 2, КАТ 3) у деконсервованих сперміях.

3.2.2. Якісні показники сперми баранів за додавання наноцитрату Mn, Zn і Cu до середовища для кріоконсервування. Дещо інші зміни фракцій розчинних протеїнів деконсервованих сперміїв баранів спостерігали за додавання наносукцинату Mn у дозі 5,0 мкг/л. Зокрема, відсоток преальбумінів, альбумінів 1 та 2 збільшився порівняно з контролем, відповідно на 15,0 %, 47,9 % ($P < 0,01$) та 6,0 %.

Проведеними дослідженнями впливу додавання наноцитратів Mn, Zn і Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів встановлено подібну дію на фізіологічні та біохімічні показники розмороженої сперми як за додавання наносукцинатів вказаних металів. Дія наноцитратів мікроелементів у складі середовища для кріоконсервування сперми на якісні показники деконсервованої сперми баранів значною мірою залежала від дози елемента. Так, додавання наноцитрату Mn у дозі 2,5 мкг/л підвищило активність деконсервованих сперміїв баранів лише на 5,6 %, порівняно з контролем (табл. 3.29). Водночас, за додавання наноцитрату Mn у дозі 5,0 мкг/л активність

спермій підвищилася на 22,2 % ($P < 0,05$) порівняно з контролем. Подальше збільшення дози наночитрату мангану до 7,5 мкг/л призвело до зниження активності спермій баранів до рівня контролю.

Додавання наночитрату Mn до середовища для кріоконсервування сперми баранів дозозалежно впливало на ушкодження спермій після розморожування. Так, якщо у контрольній групі деконсервованої сперми виявлено 13,2 % дегенерованих спермій та 25,3 % спермій з ушкодженою акросомою, то додавання до середовища для кріоконсервування наносукцинату Mn у дозі 2,5 мкг/л знизило відсоток дегенерованих спермій у розмороженій спермі на 20,0 %, а у дозі 5,0 мкг/л – на 31,4 % ($P < 0,05$) порівняно з контролем. Вища доза наносукцинату мангану (7,5 мкг/л) знизила відсоток денерованих спермій лише на 5,3 %.

Таблиця 3.29

Активність та морфологічні порушення спермій баранів за додавання наночитрату мікроелементів, %, $n = 6 \text{ M} \pm m$

Наночитрат мікроелемента, доза, мкг/л		Активність спермій (з ППР)	Дегенеровані спермії	Спермії з ушкодженою акросомою
Mn ²⁺	2,5	47,5 ± 1,12	12,0 ± 1,41	20,5 ± 1,54
	5,0	55,0 ± 1,83*	10,3 ± 0,88*	16,5 ± 1,26*
	7,5	44,2 ± 1,54	14,2 ± 1,35	21,0 ± 1,24
Zn ²⁺	2,5	50,8 ± 1,54*	12,5 ± 1,12	19,5 ± 0,99*
	5,0	56,7 ± 1,67**	9,5 ± 0,67**	15,5 ± 1,26*
	7,5	46,7 ± 2,11	12,8 ± 0,79	20,7 ± 1,28
Cu ²⁺	1,25	47,3 ± 2,67	14,5 ± 1,12	20,3 ± 1,67*
	2,5	39,2 ± 3,01	19,0 ± 1,24*	27,5 ± 1,26
	3,75	35,0 ± 1,83*	18,2 ± 0,65*	28,5 ± 2,24**
Контроль		45,0 ± 1,83	15,0 ± 1,07	23,3 ± 1,54

Подібні зміни встановлено і за кількістю спермій з ушкодженою акросомою у деконсервованій спермі баранів. Додавання до середовища для кріоконсервування сперми баранів 2,5 мкг/л наноцитрату Mn знизило відсоток спермій з ушкодженою акросомою на 12,0 %. Збільшення дози наноцитрату мангану до 5,0 мкг/л призвело до зниження кількості спермій з ушкодженою акросомою на 29,2 % ($P<0,05$) порівняно з контролем. Подальше збільшення дози наноцитрату Mn до 7,5 мкг/л знизило ушкодження акросом лише на 9,9 % порівняно з контролем.

Більш виражені зміни активності та морфологічних порушень розморожених спермій баранів встановлено і за додавання наноцитрату цинку до середовища для кріоконсервування. Зокрема, активність спермій за додавання 2,5, 5,0 і 7,5 мкг/л наноцитрату Zn зроста відповідно на 12,9 % ($P<0,05$), 26,0 % ($P<0,01$) та 3,8 % порівняно з контролем.

Водночас, відсоток спермій дегенеративних та з ушкодженням акросоми у деконсервованій спермі баранів суттєво знижувалися за додавання наноцитрату цинку до середовища для кріоконсервування. Так, за додавання 2,5, 5,0 і 7,5 мкг/л наноцитрату Zn відсоток дегенерованих спермій зменшився відповідно на 16,7 %, 36,7 % ($P<0,01$) та 14,7 % порівняно з контролем.

Аналогічно, додавання наноцитрату цинку до середовища для кріоконсервування сперми баранів у дозах 2,5, 5,0 і 7,5 мкг/л знижив відсоток спермій з ушкодженою акросомою відповідно на 16,3 % ($P<0,05$), 33,5 % ($P<0,05$) та 11,2 % порівняно з контролем.

Додавання наноцитрату купруму до середовища для кріоконсервування сперми баранів викликало дещо інші зміни активності та морфологічних порушень спермій (табл. 3.29). Зокрема, зі збільшенням дози наноцитрату Cu активність спермій у деконсервованій спермі баранів знижувалася. Так, додавання 1,25 мкг/л наноцитрату купруму призвело до підвищення активності спермій у розмороженій спермі на 5,1 %. Подальше підвищення дози наноцитрату Cu до 2,5 та 3,75 мкг/л спричинило зниження активності спермій баранів відповідно на 12,9 та 35,0 % ($P<0,05$) порівняно з контролем.

Водночас, із збільшенням дози наноцитрату купруму збільшується кількість морфологічних порушень статевих клітин – додавання 2,5 і 3,75 мкг/л наноцитрату Cu збільшило відсоток дегенерованих сперміїв у деконсервованій спермі баранів, відповідно, на 26,7 % ($P<0,05$) та 21,3 % ($P<0,05$) порівняно з контролем. Додавання наноцитрату купруму у найнижчій дозі 1,25 мкг/л призвело до незначного зменшення кількості дегенерованих сперміїв – на 3,4 % порівняно з контролем. Аналогічно, відсоток сперміїв з ушкодженням акросоми за додавання 1,25 мкг/л наноцитрату Cu знизився на 12,9 %, а за вищих доз 2,5 і 3,75 мкг/л наноцитрату купруму – навпаки підвищився відповідно на 18,0 та 22,3 % ($P<0,01$) порівняно з контролем.

Отже, додавання наноцитрату Mn і Zn у оптимальній дозі 5,0 мкг/л до середовища для заморожування сперми баранів вірогідно підвищує активність сперміїв після деконсервування, а також знижує відсоток сперміїв з морфологічними порушеннями. Додавання наноцитрату Cu у зростаючих дозах значно знижує активність сперміїв у розмороженій спермі баранів, одночасно підвищуючи відсоток дегенеративних сперміїв.

Дослідженням рухливості сперміїв комп'ютеризованою системою CASA встановлено зміни динамічних показників сперміїв за використання наноцитратів Mn, Zn і Cu у складі середовища для кріоконсервування сперми баранів. Зокрема, додавання 2,5 мкг/л наноцитрату мангану підвищило швидкість спермія при криволінійному русі (VCL) на 8,2 % ($P<0,01$), швидкість просування головки спермія по середній траєкторії руху (VAP) – на 15,0 % ($P<0,01$), а швидкість прямолінійного руху головки спермія уздовж прямого відрізка між початковою і кінцевою точками траєкторії (VSL) – на 15,3 % ($P<0,01$; табл. 3.30).

Збільшення дози наноцитрату Mn до 5,0 мкг/л забезпечило найбільше зростання кінематичних показників деконсервованих сперміїв: VCL – на 13,9 % ($P<0,01$), VAP – на 24,8 % ($P<0,01$) і VSL – на 31,4 % ($P<0,001$) порівняно з контролем. За додавання до середовища для кріоконсервування сперми баранів наноцитрату Mn у найвищій дозі 7,5 мкг/л зростання кінетичних показників

розморожених спермійв було незначним: VCL – на 4,8 %, VAP – на 0,5 % і VSL – на 7,6 % порівняно з контролем.

Таблиця 3.30

**Динамічні показники деконсервованих спермійв (CASA) баранів за
додавання наноцитрату мангану, %, n = 6, M ± m**

Показник	Доза наноцитрату мангану, мкг/л			Контроль
	2,5	5,0	7,5	
VCL, мкм/с	149,8 ± 4,54**	157,8 ± 4,41**	145,2,8±2,37	138,5 ± 4,27
VAP, мкм/с	74,2 ± 2,12**	80,5 ± 2,01**	64,2 ± 2,39	64,5 ± 2,81
VSL, мкм/с	62,5 ± 1,57**	71,2 ± 2,89***	58,3 ± 2,95	54,2 ± 2,04
LIN, %	41,9 ± 1,39	51,1 ± 1,25***	44,6 ± 2,72	39,2 ± 1,58
STR, %	84,4 ± 2,12	88,5 ± 3,45	91,0 ± 3,68*	84,4 ± 3,11
WOB, %	49,7 ± 2,03	51,1 ± 1,25*	44,6 ± 2,72	46,8 ± 2,37

Вищі значення динамічних показників спермійв баранів за дії наноцитрату Mn призвели до підвищення коефіцієнтів їх руху, проте абсолютні їх значення були незначними. Зокрема, ступінь лінійності (LIN) спермійв баранів за додавання наноцитрату мангану у дозах 2,5, 5,0 та 7,5 мкг/л мав вищі значення від контролю відповідно на 6,9 %, 30,4 (P<0,001) та 13,8 %. Зростання ступеня відхилення (WOB) руху деконсервованих спермійв баранів було незначним – відповідно на 3,5 %, 4,1 та 4,2 % порівняно з контролем. Ступінь прямолінійності руху спермійв баранів (STR) за додавання 2,5 і 5,0 мкг/л наноцитрату Mn був вищий відповідно на 4,9 та 7,8 % порівняно з контролем, а за дози 7,5 мкг/л – мав аналогічне значення з контролем.

Таку ж закономірність встановлено і при додаванні наноцитрату Zn до середовища для кріоконсервування сперми баранів. Зокрема, додавання 2,5 мкг/л наноцитрату цинку спричинило зростання кінематичних показників розморожених спермійв: VCL – на 8,3 %, VAP – на 13,8 % (P<0,01) та VSL – на 19,4 % (P<0,001) порівняно з контролем (табл. 3.31).

**Динамічні показники деконсервованих спермійв (CASA) баранів за
додавання наноцитрату цинку, %, n = 6, M ± m**

Показник	Доза наноцитрату цинку, мкг/л			Контроль
	2,5	5,0	7,5	
VCL, мкм/с	150,2 ± 4,67	162,5 ± 5,95**	145,5 ± 4,40	138,5 ± 4,27
VAP, мкм/с	74,3 ± 2,12**	80,2 ± 1,92**	65,7 ± 1,82	64,5 ± 2,81
VSL, мкм/с	64,7 ± 2,11***	71,7 ± 3,58***	58,5 ± 2,55	54,2 ± 2,04
LIN, %	43,1 ± 1,27	44,5 ± 2,84	40,3 ± 1,86	39,2 ± 1,58
STR, %	87,2 ± 3,08	89,2 ± 3,81	89,1 ± 2,79	84,4 ± 3,11
WOB, %	49,6 ± 1,21	49,6 ± 1,73	45,4 ± 2,04	46,8 ± 2,37

Найбільшу різницю кінетичних показників спермійв баранів дослідних груп порівняно з контролем встановлено за додавання 5,0 мкг/л наноцитрату Zn: VCL – на 17,3 % (P<0,01), VAP – на 24,3 % (P<0,01) та VSL – на 32,3 % (P<0,001). Збільшення дози наноцитрату цинку до 7,5 мкг/л спричинило зниження кінетичних показників спермійв у деконсервованій спермі баранів. Так, значення криволінійної швидкості (VCL), середньої швидкості (VAP) та прямолінійної швидкості (VSL) руху спермійв баранів були вищими від контролю, відповідно на 5,1 %, 1,9 та 7,9 %.

Зростання кінематичних показників руху деконсервованих спермійв баранів під впливом наноцитрату Zn спричинило збільшення коефіцієнтів рухливості. Зокрема, ступінь лінійності (LIN) спермійв баранів за додавання наноцитрату цинку у дозах 2,5, 5,0 та 7,5 мкг/л був вищим від контролю, відповідно, на 9,9 %, 13,5 та 2,8 %.

Зростання ступеня прямолінійності руху спермійв баранів (STR) було незначним – відповідно на 3,3 %, 5,7 та 5,6 % порівняно з контролем. Аналогічно, ступінь відхилення (WOB) руху деконсервованих спермійв баранів за додавання 2,5, 5,0 і 7,5 мкг/л наноцитрату Zn був вищим, відповідно на 6,0 %, 6,0 та 3,0 % порівняно з контролем.

Додавання наноцитрату Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів призвело до інших змін динамічних показників спермій після розморожування. Так, за додавання 2,5 мкг/л наноцитрату купруму кінетичні показники спермій були на рівні контролю або дещо перевищували його: VCL і VAP були вищими, відповідно на 2,7 і 10,3 % ($P<0,05$), а VSL майже не відрізнявся від контрольного значення (табл. 3.32).

Таблиця 3.32

**Динамічні показники деконсервованих спермій (CASA) баранів за
додавання наноцитрату купруму, %, n = 6, M ± m**

Показник	Доза наноцитрату купруму, мкг/л			Контроль
	1,25	2,5	3,75	
VCL, мкм/с	142,2 ± 4,26	135,5 ± 5,95	124,2 ± 4,37**	138,5 ± 4,27
VAP, мкм/с	69,2 ± 2,12*	60,2 ± 2,15	51,3 ± 1,71**	64,5 ± 2,81
VSL, мкм/с	54,0 ± 2,27	46,3 ± 3,58**	40,2 ± 3,15**	54,2 ± 2,04
LIN, %	38,1 ± 1,63	34,3 ± 2,65*	32,5 ± 2,45*	39,2 ± 1,58
STR, %	78,2 ± 3,11	77,1 ± 5,88	78,2 ± 5,24	84,4 ± 3,11
WOB, %	52,5 ± 1,02	52,9 ± 2,26	47,9 ± 2,64	46,8 ± 2,37

Додавання вищих доз наноцитрату Cu призвело до зниження динамічних параметрів спермій баранів після деконсервування. Так, за додавання 2,5 мкг/л наноцитрату купруму показники руху спермій VCL, VAP і VSL були нижчими від контролю, відповідно на 2,2 %, 6,7 та 14,6 % ($P<0,01$). Подальше збільшення дози наноцитрату Cu до 3,75 мкг/л призвело до вірогідного зниження всіх досліджуваних параметрів руху спермій: VCL, VAP і VSL відповідно на 10,3 %, 20,5 та 25,8 % ($P<0,01-0,001$).

Зменшення значень кінетичних параметрів деконсервованих спермій під впливом наноцитрату Cu спричинило зниження коефіцієнтів рухливості. Так, ступінь лінійності (LIN) спермій баранів за додавання наноцитрату купруму у дозах 1,25, 2,5 та 3,75 мкг/л був нижчим від контролю, відповідно, на 2,8 %, 12,5 % ($P<0,05$) та 17,1 % ($P<0,05$).

Зниження ступеня прямолінійності руху спермій баранів (STR) було дещо меншим – відповідно на 7,3 %, 8,7 та 7,3 % порівняно з контролем. За ступенем відхилення (WOB) руху деконсервованих спермій баранів зменшення порівняно з контролем становило, відповідно на 12,2 %, 13,0 та 2,4 %.

Отже, додавання наноцитрату Mn і Zn у дозі 5,0 мкг/л до середовища для заморожування сперми баранів вірогідно підвищує кінематичні показники спермій VCL, VAP, VSL після деконсервування, збільшуючи водночас коефіцієнти рухливості LIN, STR і WOB. Додавання наноцитрату Cu у зростаючих дозах значно знижує динамічні параметри спермій у розмороженій спермі баранів, одночасно знижуючи коефіцієнти рухливості.

Дослідженням часу виживання (виживаності) деконсервованих спермій баранів встановлено її зміни за додавання наноцитратів Mn, Zn та Cu до середовища для кріоконсервування сперми. Зокрема, додавання наноцитрату Mn до середовища для кріоконсервування сперми баранів у дозах 2,5 і 7,5 мкг/л спричинило незначне зростання виживаності деконсервованих спермій – відповідно на 2,7 та 8,3 % ($P < 0,05$; табл. 3.33). Водночас, за додавання 5,0 мкг/л наноцитрату мангану виживаність спермій у розмороженій спермі баранів підвищилася на 12,6 % на ($P < 0,01$).

Таблиця 3.33

Виживаність деконсервованої сперми баранів (+4°C) за додавання наноцитратів мікроелементів, год, $n = 6 \text{ M} \pm m$

Наноцитрат мікроелемента, доза, мкг/л	Mn ²⁺	Zn ²⁺	Cu ²⁺
7,5 / 3,75*	101,3 ± 2,90*	95,2 ± 2,64	64,7 ± 2,78
5,0 / 2,5*	105,3 ± 2,04**	99,0 ± 2,96*	75,3 ± 2,78*
2,5 / 1,25*	96,0 ± 1,93*	94,0 ± 1,93	83,7 ± 2,99***
Контроль	93,5 ± 1,84	93,5 ± 1,84	93,5 ± 1,84***

* - дози наноцитратів Cu²⁺

Подібне збільшення часу виживання деконсервованих спермійв баранів встановили за додавання наноцитрату Zn: якщо за додавання наносукцинату Zn до середовища для кріоконсервування сперми у дозах 2,5 і 7,5 мкг/л виживаність деконсервованих спермійв не відрізнялася від контролю, то за додавання 5,0 мкг/л наноцитрату Zn до середовища для кріоконсервування сперми виживаність була вища від контролю на 5,9 % ($P < 0,05$).

Додавання наноцитрату Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів спричинило протилежні зміни виживаності спермійв – із збільшенням дози зменшується час виживання статевих клітин. Так, за додавання 1,25 мкг/л наноцитрату купруму знизило виживаність деконсервованих спермійв на 10,5 % ($P < 0,05$), а за додавання доз 2,5 та 3,75 мкг/л виживаність спермійв зменшилася відповідно на 19,5 % ($P < 0,001$) та 30,8 % ($P < 0,001$).

Отже, додавання наноцитрату Mn і Zn у дозі 5,0 мкг/л до середовища для заморожування сперми баранів вірогідно підвищує виживаність спермійв, а додавання наноцитрату Cu у зростаючих дозах значно знижує час виживання статевих клітин.

Дослідженням активності ензимів – маркерів запліднювальної здатності спермійв СДГ і ЦО встановлено дозозалежні розбіжності у деконсервованій спермі баранів. Так, за додавання наноцитрату Mn у дозах 2,5, 5,0 та 7,5 мкг/л до середовища для кріоконсервування сперми баранів активність СДГ у розморожених сперміях підвищилася, відповідно, на 32,2 % ($P < 0,01$), 72,5 % ($P < 0,001$) та 56,1 % ($P < 0,01$; табл. 3.34). Дещо менше зростання активності ЦО у деконсервованих сперміях встановлено за додавання наноцитрату Mn у дозах 2,5 та 5,0 мкг/л – відповідно на 8,0 % та 24,5 % ($P < 0,01$), а за дози 7,5 мкг/л активність ензиму була на рівні контролю.

Аналогічні результати отримали і за додавання наноцитрату Zn до середовища для кріоконсервування сперми баранів. Зокрема, додавання наноцитрату цинку у дозах 2,5, 5,0 та 7,5 мкг/л підвищило активність СДГ у розморожених сперміях, відповідно, на 51,8 % ($P < 0,01$), 63,5 % ($P < 0,001$) та 53,7 % ($P < 0,05$) порівняно з контролем. Активність ЦО у деконсервованих

сперміях за додавання наноцитрату Zn у дозах 2,5 та 5,0 мкг/л значно менше зросла порівняно з контролем – відповідно на 3,3 % та 20,8 % ($P<0,05$), а у дозі 7,5 мкг/л активність ензиму була на рівні контролю.

Таблиця 3.34

Активність СДГ і ЦО у розморожених сперміях баранів за додавання наноцитратів мікроелементів, $n = 6 \text{ M} \pm m$

Наноцитрат мікроелемента, доза, мкг/л		Активність ензимів, од	
		СДГ	ЦО
Mn ²⁺	2,5	33,7 ± 2,16**	43,2 ± 2,77
	5,0	44,0 ± 3,24***	49,8 ± 2,26**
	7,5	39,8 ± 4,18**	39,7 ± 1,69
Zn ²⁺	2,5	38,7 ± 2,70**	41,3 ± 2,57
	5,0	41,7 ± 3,04***	48,3 ± 1,80*
	7,5	39,2 ± 4,04**	40,2 ± 1,94
Cu ²⁺	1,25	31,5 ± 1,89*	41,0 ± 2,25
	2,5	29,2 ± 2,93*	35,5 ± 1,75*
	3,75	19,2 ± 3,67*	29,0 ± 1,83**
Контроль		25,5 ± 1,59	40,0 ± 2,52

Дещо інші зміни активності ензимів – маркерів запліднювальної здатності встановили за додавання наноцитрату Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів. Зокрема, додавання 1,25 мкг/л наноцитрату купруму призвело до підвищення активності СДГ і ЦО, відповідно на 23,5 % ($P<0,05$) та 2,5 %. Збільшення дози наноцитрату Cu до 2,5 мкг/л активність СДГ і ЦО знизилася, відповідно, на 14,5 % ($P<0,05$) та 11,2 % ($P<0,05$) порівняно з контролем. Із збільшенням дози наноцитрату Cu до 3,75 мкг/л активність СДГ і ЦО суттєво знизилася – відповідно на 24,7 % ($P<0,01$) та 27,5 % ($P<0,01$) порівняно з контролем.

Отже, додавання наноцитрату Mn і Zn у дозі 5,0 мкг/л до середовища для заморожування сперми баранів вірогідно підвищує активність

сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази у сперміях після деконсервування, а додавання наночитрату Cu у зростаючих дозах значно знижує активність цих ензимів.

Дослідженням інтенсивності споживання кисню сперміями встановлено зміни дихальної та відновної активності деконсервованої сперми баранів за додавання наночитрату Mn, Zn і Cu до середовища для кріоконсервування. Так, додавання наночитрату мангану у дозах 2,5 та 7,5 мкг/л призвело до незначного зростання дихальної активності сперми баранів – відповідно, на 4,5 і 9,1 % порівняно з контролем (табл. 3.35). Водночас, за додавання 5 мкг/л наночитрату Mn дихальна активність сперми баранів була максимально вищою від контролю – на 18,2 % ($P < 0,05$).

Таблиця 3.35

Дихальна і відновна активність розмороженої сперми баранів за додавання наночитратів мікроелементів, $n = 6$, $M \pm m$

Наночитрат мікроелемента, доза, мкг/л		Дихальна активність, нг-атом O_2 /0,1 мл×хв	Відновна активність, mV/0,1 мл×хв
Mn ²⁺	2,5	2,30 ± 0,13	0,18 ± 0,012
	5,0	2,60 ± 0,11*	0,16 ± 0,009*
	7,5	2,40 ± 0,12	0,20 ± 0,012
Zn ²⁺	2,5	2,38 ± 0,12	0,19 ± 0,009
	5,0	2,93 ± 0,13*	0,15 ± 0,014*
	7,5	2,50 ± 0,14	0,18 ± 0,011
Cu ²⁺	1,25	2,42 ± 0,11	0,19 ± 0,010
	2,5	2,03 ± 0,13	0,23 ± 0,02*
	3,75	1,80 ± 0,13*	0,38 ± 0,024***
Контроль		2,20 ± 0,15	0,20 ± 0,013

Протилежну закономірність спостерігали за відновною активністю деконсервованої сперми баранів під впливом наночитрату мангану. Зокрема, за додавання наночитрату Mn спостерігали зниження відновної активності сперми

порівняно з контролем: у дозі 2,5 мкг/л – на 10, %, 5,0 мкг/л – 20,0 % ($P<0,05$), а у дозі 7,5 мкг/л вона не відрізнялася від контрольного значення.

Подібну тенденцію щодо змін дихальної та відновної активності розмороженої сперми баранів встановлено і за додавання наноцитрату Zn до середовища для кріоконсервування. Так, додавання 5,0 мкг/л наноцитрату цинку спричинило найбільше зростання дихальної активності сперми – на 33,2 % ($P<0,001$) з одночасним зниженням відновної активності на 25,0 % ($P<0,05$) порівняно до контролю. За додавання наноцитрату Zn у дозах 2,5 та 7,5 мкг/л встановлено підвищення дихальної активності сперми баранів, відповідно на 8,2 % та 13,6 % і зниження відновної активності відповідно на 5,0 % та 10,0 %.

Додавання наноцитрату Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів спричинило дещо інші зміни споживання кисню у деконсервованій спермі – збільшення дози знижує дихальну активність та підвищує відновну активність. Зокрема, за додавання 1,25 мкг/л наноцитрату купруму дихальна активність сперми баранів була вищою на 10,0 %, а відновна активність – нижчою на 5,0 %, ніж контрольні значення. Додавання 2,5 мкг/л наноцитрату Cu призводить до зниження дихальної та підвищення відновної активності розмороженої сперми баранів, відповідно, на 7,7 % та 50,0 % ($P<0,01$), а у дозі 3,75 мкг/л дихальна активність була меншою на 18,2 % ($P<0,01$), а відновна активність більшою на 90,0 % ($P<0,001$), порівняно з контролем.

Отже, додавання наноцитрату Mn і Zn до середовища для кріоконсервування сперми баранів підвищує дихальну та знижує відновну активність деконсервованої сперми з найбільшою вірогідністю за дози обох мікроелементів 5,0 мкг/л, що вказує на підвищення активності сперміїв. Додавання ж наноцитрату Cu проявляє протилежну дію на споживання кисню спермою баранів, знижуючи тим самим її якість.

Додавання наноцитрату Mn Zn і Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів призвело до змін вмісту фракцій розчинних протеїнів у розморожених сперміях. Зокрема, додавання наноцитрату Mn у дозі 2,5 мкг/л

збільшило частку преальбумінів та альбумінів 2 відповідно на 46,7 % ($P<0,05$) та 13,4 % ($P<0,05$) з одночасним зменшенням вмісту фракції альбумінів 1 на 19,8 % ($P<0,01$) порівняно з контролем (табл. 3.36). Водночас, вміст фракцій α - і γ -глобулінів у деконсервованих сперміях баранів був меншим порівняно з контролем, відповідно на 10,2 % та 14,8 % ($P<0,05$), а частка β -глобулінів навпаки – вищою на 26,3 % від контрольних значень.

Подібні зміни вмісту фракцій розчинних протеїнів у розморожених сперміях баранів спостерігали за додавання 7,5 мкг/л наноцитрату мангану. Так, вміст фракції преальбумінів та альбумінів 2 був більшим від контрольних показників, відповідно на 34,8 % ($P<0,01$) і 20,5 % ($P<0,05$), а частка альбумінів 1 навпаки – нижчою на 30,9 % ($P<0,05$) від значень контрольної групи. Вміст β -глобулінів у деконсервованих сперміях баранів збільшився на 10,5 %, а вміст фракцій α - та γ -глобулінів зменшився, відповідно на 26,5 % ($P<0,01$) і 5,7 % порівняно з контролем.

Таблиця 3.36

Вміст фракцій розчинних протеїнів у розморожених сперміях баранів за додавання наноцитрату мангану, $n = 6$, $M \pm m$

Фракція протеїнів, %	Доза наноцитрату мангану, мкг/л			Контроль
	2,5	5,0	7,5	
преальбуміни	$27,0 \pm 4,48^*$	$22,7 \pm 3,16$	$24,8 \pm 3,41^{**}$	$18,4 \pm 3,73$
альбуміни 1	$13,0 \pm 0,97^{**}$	$12,0 \pm 0,97^*$	$11,2 \pm 0,95^*$	$16,2 \pm 1,45$
альбуміни 2	$12,7 \pm 1,12^*$	$16,5 \pm 1,61^*$	$13,5 \pm 1,23^*$	$11,2 \pm 1,14$
α -глобуліни	$4,4 \pm 0,24$	$2,9 \pm 0,25^{**}$	$3,6 \pm 0,17^*$	$4,9 \pm 0,34$
β -глобуліни	$2,4 \pm 0,18$	$2,2 \pm 0,17$	$2,1 \pm 0,19$	$1,9 \pm 0,27$
γ -глобуліни	$40,5 \pm 3,29^*$	$43,7 \pm 1,84$	$44,8 \pm 2,81$	$47,5 \pm 2,09$

Дещо інші зміни фракцій розчинних протеїнів деконсервованих спермій баранів спостерігали за додавання наноцитрату Mn у дозі 5,0 мкг/л. Зокрема, відсоток преальбумінів, альбумінів 2 та β -глобулінів збільшився порівняно з контролем, відповідно на 23,4 %, 47,3 % ($P<0,05$) та 15,8 %. Водночас, вміст

фракцій альбумінів 1, α - і γ -глобулінів у деконсервованих сперміях баранів був меншим, відповідно на 25,9 % ($P<0,05$), 40,9 % ($P<0,01$) та 8,0 % порівняно з контролем.

Подібні зміни вмісту фракцій розчинних протеїнів у розморожених сперміях спричинило додавання наноцитрату цинку до середовища для кріоконсервування сперми баранів. Так, за додавання 2,5 мкг/л наноцитрату Zn вміст преальбумінів, альбумінів 2 та β -глобулінів став більшим, відповідно, на 64,1 % ($P<0,05$), 36,6 % ($P<0,05$) та 21,1 % порівняно з контролем (табл. 3.37). Натомість, вміст альбумінів 1, α - і γ -глобулінів у деконсервованих сперміях баранів був меншим від контролю, відповідно на 18,5 %, 16,3 % та 26,3 % ($P<0,001$). Майже такі ж зміни вмісту фракцій розчинних протеїнів у розморожених сперміях баранів спостерігали за додавання 7,5 мкг/л наноцитрату цинку. Зокрема, вміст фракцій преальбумінів, альбумінів 2 та β -глобулінів був більшим від контролю, відповідно, на 24,5 % ($P<0,05$), 42,9 % ($P<0,01$) та 63,2 % ($P<0,05$), а відсоток альбумінів 1 не відрізнявся від значення контрольної групи. Вміст α - і γ -глобулінів у деконсервованих сперміях баранів був меншим, відповідно, на 20,4 % ($P<0,05$) та 18,3 % ($P<0,001$) від контрольних значень.

Таблиця 3.37

Вміст фракцій розчинних протеїнів у розморожених сперміях баранів за додавання наноцитрату цинку, $n = 6$, $M \pm m$

Фракція протеїнів, %	Доза наноцитрату цинку, мкг/л			Контроль
	2,5	5,0	7,5	
преальбуміни	30,2 $\pm$ 3,14*	25,8 $\pm$ 3,20	22,9 $\pm$ 3,46*	18,4 $\pm$ 3,73
альбуміни 1	13,2 $\pm$ 1,01	13,3 $\pm$ 0,88	16,0 $\pm$ 0,97	16,2 $\pm$ 1,45
альбуміни 2	15,3 $\pm$ 0,88*	13,5 $\pm$ 1,23	16,0 $\pm$ 1,07**	11,2 $\pm$ 1,14
α -глобуліни	4,1 $\pm$ 0,32	4,3 $\pm$ 0,26	3,9 $\pm$ 0,17*	4,9 $\pm$ 0,34
β -глобуліни	2,3 $\pm$ 0,20	1,7 $\pm$ 0,16	3,1 $\pm$ 0,19*	1,9 $\pm$ 0,27
γ -глобуліни	34,8 $\pm$ 2,83***	41,3 $\pm$ 2,20*	38,8 $\pm$ 2,63***	47,5 $\pm$ 2,09

Подібні зміни фракцій розчинних протеїнів деконсервованих спермій баранів спостерігали за додавання наноцитрату Zn у дозі 5,0 мкг/л. Зокрема, відсоток преальбумінів, альбумінів 2 і β -глобулінів збільшився порівняно з контролем, відповідно на 40,2 %, 20,5 % і 10,5 %. Натомість вміст α - і γ -глобулінів у деконсервованих сперміях баранів був меншим, відповідно, на 12,2 % та 13,1 % ($P < 0,05$) від контрольних значень.

Додавання наноцитрату Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів теж викликало зміни вмісту фракцій розчинних протеїнів у розморожених сперміях. Зокрема, за додавання 1,25 мкг/л наноцитрату купруму спостерігали збільшення вмісту преальбумінів, альбумінів 1 і 2 відповідно на 7,6 %, 32,7 % ($P < 0,05$) та 58,9 % ($P < 0,01$) порівняно з контролем (табл. 3.38). Водночас, вміст α - і γ -глобулінів у деконсервованих сперміях баранів був меншим, відповідно, на 18,4 % та 27,8 % ($P < 0,001$) від контрольних значень за вищого вмісту β -глобулінів на 36,8 %.

Таблиця 3.38

Вміст фракцій розчинних протеїнів у розморожених сперміях баранів за додавання наноцитрату купруму, $n = 6$, $M \pm m$

Фракція протеїнів, %	Доза наноцитрату купруму, мкг/л			Контроль
	1,25	2,5	3,75	
преальбуміни	$19,8 \pm 3,15$	$20,8 \pm 3,78$	$22,4 \pm 3,22^*$	$18,4 \pm 3,73$
альбуміни 1	$21,5 \pm 0,76^*$	$19,8 \pm 0,95$	$16,3 \pm 0,88$	$16,2 \pm 1,45$
альбуміни 2	$17,8 \pm 0,60^{**}$	$16,3 \pm 0,88^{**}$	$14,3 \pm 0,84^*$	$11,2 \pm 1,14$
α - глобуліни	$4,0 \pm 0,26$	$3,1 \pm 0,25^*$	$4,5 \pm 0,17$	$4,9 \pm 0,34$
β - глобуліни	$2,6 \pm 0,18$	$1,6 \pm 0,17$	$2,9 \pm 0,20^*$	$1,9 \pm 0,27$
γ - глобуліни	$34,3 \pm 3,10^{***}$	$38,3 \pm 2,46^*$	$39,5 \pm 2,88^{***}$	$47,5 \pm 2,09$

Такі ж відмінності за вмістом фракцій розчинних протеїнів у деконсервованих сперміях баранів спостерігали і за додавання наноцитрату Cu у дозах 2,5 та 3,75 мкг/л. Використання дози наноцитрату купруму 2,5 мкг/л призвело до збільшення вмісту преальбумінів на 13,0 %, альбумінів 1 – на

22,2 %, альбумінів 2 – на 45,5 % ($P<0,01$) і одночасне зменшення вмісту α -, β - і γ -глобулінів у деконсервованих сперміях баранів, відповідно, на 36,7 % ($P<0,05$), 15,8 % та 19,4 % ($P<0,05$) порівняно з контролем.

Застосування ж дози наноцитрату Cu 3,75 мкг/л спричинило збільшення у деконсервованих сперміях баранів вмісту преальбумінів, альбумінів 2 і β -глобулінів, відповідно на 21,7 % ($P<0,05$), 27,7 % ($P<0,05$) та 52,6 % ($P<0,05$) і одночасне зменшення вмісту α -глобулінів на 8,2 % і γ -глобулінів – на 16,8 % ($P<0,001$) порівняно з контролем. Водночас, вміст альбумінів 1 у розморожених сперміях баранів був на рівні контролю.

Отже, додавання наноцитрату Mn, Zn і Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів викликає значні зміни вмісту фракцій розчинних протеїнів у розморожених сперміях, збільшуючи відсоток альбумінів за рахунок зменшення вмісту глобулінів.

Додавання наноцитратів Mn, Zn і Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів викликає зміни активності ензимів антиоксидантного захисту у розморожених сперміях. Так, додавання 2,5 мкг/л наноцитрату Mn спричинило зниження активності СОД на 14,5 % з одночасним підвищенням активності ГПО на 15,2 %, а КАТ – на 7,5 % порівняно з контролем (табл. 3.39). За додавання наноцитрату мангану у дозі 5,0 мкг/л різниця активності ензимів антиоксидантного захисту у деконсервованих сперміях була найвищою порівняно з контролем: активність СОД знизилася на 29,6 % ($P<0,01$), а активність ГПО та КАТ зросла, відповідно на 43,5 % ($P<0,01$) і 40,0 % ($P<0,05$). Водночас, за додавання 7,5 мкг/л наноцитрату Mn різниця активності ензимів антиоксидантного захисту у розморожених сперміях баранів з контролем була незначною або відсутньою: активність СОД була меншою на 7,1 % від контролю, а ГПО і КАТ – вищою відповідно, на 2,2 % і 5,0 %.

Подібні зміни активності ензимів антиоксидантного захисту у деконсервованих сперміях встановлено і за додавання наноцитрату Zn до середовища для кріоконсервування сперми баранів. Зокрема, додавання наноцитрату цинку у дозах 2,5, 5,0 та 7,5 мкг/л спричинило зниження

активності СОД у розморожених сперміях баранів, відповідно, на 18,3 % ($P<0,05$), 33,8 % ($P<0,01$) і 10,4 %, а активність ГПО навпаки підвищилася відповідно, на 13,0 %, 39,1 % ($P<0,01$) і 4,3 %. Водночас, активність КАТ у деконсервованих сперміях баранів значно підвищилася порівняно з контролем за дози наноцитрату Zn 5,0 мкг/л – на 37,5 % ($P<0,05$), а за інших доз – лише на 10,0 та 5,0 %.

Таблиця 3.39

Активність ензимів антиоксидантного захисту у розморожених сперміях баранів за додавання наноцитрату мікроелементів, $n = 6$, $M \pm m$

Наноцитрат мікроелемента, доза, мкг/л		СОД, МО/мг білка	ГПО, мкмоль/хв × мг білка	КАТ, мкмоль/хв × мг білка
Mn ²⁺	2,5	47,3 ± 2,11	0,53 ± 0,040	0,43 ± 0,027
	5,0	38,5 ± 1,77**	0,66 ± 0,039**	0,56 ± 0,037*
	7,5	50,8 ± 1,88	0,47 ± 0,045	0,42 ± 0,029
Zn ²⁺	2,5	44,7 ± 2,39*	0,52 ± 0,028	0,44 ± 0,024
	5,0	36,2 ± 1,85**	0,64 ± 0,038**	0,55 ± 0,043*
	7,5	49,0 ± 1,75	0,48 ± 0,038	0,42 ± 0,031
Cu ²⁺	1,25	58,1 ± 2,44	0,41 ± 0,024	0,39 ± 0,033
	2,5	65,0 ± 2,88*	0,32 ± 0,037*	0,35 ± 0,040
	3,75	71,3 ± 2,68**	0,29 ± 0,036***	0,30 ± 0,027*
Контроль		54,7 ± 2,58	0,46 ± 0,026	0,40 ± 0,025

Додавання наноцитрату Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів спричинило протилежні зміни активності ензимів антиоксидантного захисту у розморожених сперміях. Так, за додавання 1,25 мкг/л наноцитрату купруму активність СОД підвищилася на 6,2 %, а ГПО і КАТ навпаки знизилася, відповідно, на 10,9 % та 2,5 % порівняно з контролем. Зі збільшенням дози наноцитрату Cu різниця стала значнішою: за додавання 2,5 мкг/л активність СОД зростає 18,8 % ($P<0,05$), а активність ГПО і КАТ

знижується, відповідно, на 28,5 % ($P<0,05$) та 12,5 %. Ще більшою є різниця активності ензимів антиоксидантного захисту у розморожених сперміях баранів з контролем за дози наноцитрату Cu 3,75 мкг/л: активність СОД вища на 30,3 % ($P<0,01$), активність ГПО і КАТ нижча, відповідно, на 37,0 % ($P<0,001$) і 25,0 % ($P<0,05$).

Отже, за додавання наноцитратів Mn і Zn до середовища для кріоконсервування сперми баранів інтенсифікується активність ензимів антиоксидантного захисту у розморожених сперміях, що вказує на їх вищу якість за оптимальної дози 0,5 мкг/л. Водночас, додавання наноцитрату Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів у зростаючих дозах підвищує активність СОД та знижує активність ГПО і КАТ, що свідчить про зниження якості сперміїв.

Дослідженням ізозимів каталази (КАТ 1, КАТ 2, КАТ 3) встановлено зміни їх вмісту у деконсервованих сперміях баранів під впливом додавання наноцитрату Mn, Zn і Cu до середовища для заморожування сперми. Так, додавання 2,5 мкг/л наноцитрату Mn призвело до збільшення у розморожених сперміях баранів вмісту КАТ 1 на 5,4 %, КАТ 3 – на 22,2 % та зменшення вмісту КАТ 2 на 21,3 % ($P<0,05$) порівняно з контролем (табл. 3.40). Подібною була різниця вмісту ізозимів каталази у деконсервованих сперміях баранів за доз наноцитрату мангану 5,0 і 7,5 мкг/л. Зокрема, додавання наноцитрату Mn у дозі 5,0 мкг/л призвело до підвищення вмісту КАТ 1 на 3,3 % та КАТ № на 18,4 % з одночасним зниженням відсотка КАТ 2 на 15,9 % ($P<0,05$) порівняно з контролем. За додавання наноцитрату Mn у дозі 7,5 мкг/л вміст КАТ 3 збільшився на 8,7 %, КАТ 2, навпаки знизився на 6,0 % порівняно з контролем, вміст КАТ 3 не відрізнявся від контрольного значення.

За додавання наноцитрату Zn до середовища для кріоконсервування сперми баранів теж встановлено зміни вмісту ізозимів каталази у деконсервованих сперміях. Так, додавання 2,5 мкг/л наноцитрату Zn призвело до зменшення у розморожених сперміях баранів вмісту КАТ 1 і КАТ 2, відповідно, на 73,2 % і 8,4 % ($P<0,05$), а також підвищення вмісту КАТ 3 на

29,5 % ($P < 0,05$) порівняно з контролем. За додавання наноцитрату цинку у дозі 5,0 мкг/л зменшився вміст КАТ 1 на 16,3 % ($P < 0,05$), КАТ 2 – на 12,3 %, а КАТ 3 підвищився на 56,0 % ($P < 0,05$) порівняно з контролем. Водночас, додавання наноцитрату Zn у дозі 7,5 мкг/л призвело до зниження вмісту КАТ 1 на 19,6 %, КАТ 2 – лише на 1,5 % з одночасним підвищенням вмісту КАТ 3 на 45,9 % порівняно з контролем.

Таблиця 3.40

Вміст ізозимів каталази у розморожених сперміях баранів за додавання наноцитрату мікроелементів, $n = 6$, $M \pm m$

Наноцитрат мікроелемента, доза, мкг/л		Ізозими каталази, %		
		КАТ 1	КАТ 2	КАТ 3
Mn ²⁺	2,5	48,5 ± 1,78	26,2 ± 1,87**	25,3 ± 2,69
	5,0	47,5 ± 2,11	28,0 ± 1,65*	24,5 ± 3,25
	7,5	46,2 ± 2,83	31,3 ± 1,71	22,5 ± 3,13
Zn ²⁺	2,5	42,7 ± 3,14	30,5 ± 2,14*	26,8 ± 3,44
	5,0	38,5 ± 2,11*	29,2 ± 1,14	32,3 ± 2,81*
	7,5	37,0 ± 2,96	32,8 ± 1,20*	30,2 ± 3,00
Cu ²⁺	1,25	38,5 ± 1,78*	29,0 ± 2,27*	31,5 ± 2,51*
	2,5	39,2 ± 2,69	29,2 ± 1,64	31,7 ± 3,84
	3,75	31,7 ± 2,19**	30,8 ± 1,20	37,5 ± 3,03*
Контроль		46,0 ± 1,90	33,3 ± 1,59	20,7 ± 3,36

За додавання наноцитрату Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів теж встановлено зміни вмісту ізозимів каталази у деконсервованих сперміях, проте іншого характеру. Зокрема, додавання 1,25 мкг/л наноцитрату купруму призвело до зменшення у розморожених сперміях баранів вмісту КАТ 1 на 16,3 % ($P < 0,05$) і КАТ 2 на 12,9 % ($P < 0,05$) та збільшення вмісту КАТ 3 на 53,1 % ($P < 0,05$) порівняно з контролем. За додавання наноцитрату Cu у дозі 2,5 мкг/л знизився вміст КАТ 1 на 14,8 %, КАТ 2 на 12,3 %, а КАТ 3 підвищився на 56,0 % порівняно з контролем.

КАТ 2 – на 12,3 %, а вміст КАТ 3 підвищився на 53,1 % порівняно з контролем. Водночас, додавання наночитрату купруму у дозі 3,75 мкг/л призвело до зменшення вмісту КАТ 1 на 68,9 % ($P < 0,001$), КАТ 2 – на 7,5 % з одночасним збільшенням вмісту КАТ 3 на 81,2 % ($P < 0,05$) порівняно з контролем.

Отже, додавання наночитрату Mn, Zn і Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів спричиняє дозозалежні зміни вмісту ізозимів каталази (КАТ 1, КАТ 2, КАТ 3) у деконсервованих сперміях.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Одним з завдань продовольчої безпеки держави є забезпечення населення якісним м'ясом і, зокрема, бараниною. За роки незалежності України склалася негативна тенденція розвитку вівчарства, коли поголів'я овець до 2020 року скоротилося у 9 разів [246]. Проте, зважаючи на позитивні економічні і соціальні зміни в Україні, в останні роки почалося поступове зростання поголів'я овець. Станом на 1 січня 2022 року в Україні на підприємствах поголів'я овець та кіз зросло на 7,1%, порівняно з минулим роком, і становить 162,1 тис. тварин [247]. Фермери для підвищення конкурентоздатності стали розвивати м'ясне вівчарство, використовуючи спеціалізовані м'ясні породи овець імпортової селекції, однією з яких є тексель. Вівці цієї породи характеризуються інтенсивністю росту та розвитку молодняку, скоростиглістю, чудовими смаковими якостями м'яса. При схрещуванні з іншими породами вівці породи тексель передають м'ясні ознаки потомству вже в першому поколінні [248]. Це робить привабливим використання овець цієї породи для промислового схрещування з місцевими породами і отримання більшої кількості якісного м'яса.

Серед комплексу чинників, які впливають на відтворення стада, годівля баранів-плідників займає чільне місце, оскільки для нормального сперміогенезу необхідно забезпечити самців повноцінним раціоном. У період статевого спокою годівля баранів-плідників зосереджена на забезпеченні нормального функціонування організму [4, 249], тому виникає потреба збільшити раціони вітамінами та мікроелементами. З цією метою ми розробили кормову добавку у формі ліпосомальної емульсії, до складу якої включили вітаміни А, D₃, Е, С та цинку глюконат. Ліпосомальна емульсія забезпечує пролонгований ефект, захищає діючі речовини під час проходження їх через травний тракт використанням лецитину та твіну.

Підбір компонентів розробленої добавки мотивований численними літературними даними, у яких показана позитивна дія окремих вітамінів та мікроелементів. Зокрема, вітамін А володіє антиоксидантними властивостями, а його дефіцит викликає аномалії спермійв [250]. У наших дослідженнях очевидно за рахунок додавання вітаміну А вірогідно ($P < 0,001$) знизилася кількість дегенерованих спермійв. Вітамін D₃ також позитивно впливає на сперматогенез. Експериментальні дослідження підтверджують сприятливий вплив вітаміну D на репродуктивну здатність самців через модуляцію вироблення гормонів за допомогою геномних і негеномних дій, і, зокрема, покращенням якості сперми [251]. Вітамін Е, як антиоксидант, запобігає окисненню жирних кислот, забезпечує стійкість і активність епітелію слизових оболонок статеві системи. Додавання до раціонів вітаміну Е у поєднанні з Селеном збільшувало лібідо баранів, якісні показники сперми та активність глутатіонпероксидази у спермі [252]. Вітамін С завдяки сильним антиоксидантним властивостям відіграє значну роль у регуляції окисно-відновних процесів, активує синтез колагену і проколагену, стероїдних гормонів і катехоламінів, обмін фолієвої кислоти та заліза. Чимало досліджень підтверджують сумісну позитивну дію вітамінів Е і С на якісні показники сперми баранів [110, 253]. Комплексне застосування вітамінів А, D₃ та Е забезпечує підвищення загальної резистентності організму тварин, покращення їх стану здоров'я та репродуктивної функції. Ролі Цинку у репродуктивній функції присвячено багато досліджень. Зокрема, широко висвітлена визначальна роль цього мікроелемента у фертильності самців [254-256]. Також встановлена ефективність згодовування органічних форм цинку [257] і його комбінації з біологічно активними речовинами [258] з позитивною дією на синтез тестостерону, статеву активність та якісні показники сперми баранів.

Аналізом результатів проведених досліджень підтверджено позитивну дію згодовування баранам ліпосомальної добавки з вітамінами А, D₃, Е, С та цинку глюконатом у період статевого спокою на гематологічні показники. Зокрема, встановлено суттєве зростання концентрації гемоглобіну, вмісту

еритроцитів, тромбоцитів та гематокриту на фоні зниження вмісту лейкоцитів. Це може вказувати на посилення обмінних процесів та інтенсифікацію захисних сил в організмі баранів-плідників. Свідченням позитивної дії компонентів ліпосомальної добавки є значне збільшення об'єму еякуляту баранів та кількості спермій у ньому, а також зростання життєздатності статевих клітин. Водночас, вірогідно знижується відсоток спермій з цитоплазматичними краплями, що вказує на позитивний вплив на сперматогенез згодовування вітамінів А, D₃, Е, С та глюконату цинку у фізіологічно обґрунтованих співвідношеннях.

Нашими дослідженнями підтверджено позитивну дію згодовування баранам ліпосомальної добавки з вітамінами А, D₃, Е, С та цинку глюконатом у період статевого спокою на якісні показники сперми. Зокрема, встановлено вірогідне ($P < 0,05$) підвищення активності спермій баранів. Свідченням позитивної дії компонентів ліпосомальної добавки є значне збільшення кінетичних показників спермій баранів: криволінійної (VCL), прямолінійної (VSL) та середньої швидкості (VAP) руху спермій ($P < 0,05-0,001$). Це може слугувати потенційним високим рівнем запліднення та вказує на позитивний вплив згодовування вітамінів А, D₃, Е, С та глюконату цинку у фізіологічно обґрунтованих співвідношеннях.

Важливе значення в оцінці якості сперми має визначення запліднювальної здатності спермій. Доведено, що ензими СДГ і ЦО є маркерами для встановлення запліднювальної здатності спермій самців сільськогосподарських тварин [259]. У наших дослідженнях згодовування баранам ліпосомальної добавки з вітамінами А, D₃, Е, С та цинку глюконату у період статевого спокою підвищує активність СДГ і ЦО у сперміях баранів з високою вірогідністю ($P < 0,05-0,001$), що може вказувати на підвищення запліднювальної здатності гамет.

Експериментально доведено наявність у спермі ефективної ензиматичної системи антиоксидантного захисту, яка знищує надлишок утворених активних форм Оксигену і тим самим підвищує якість спермій. Основними ензимами

антиоксидантного захисту є СОД, ГПО і КАТ [260]. У нашому експерименті після згодовування вітамінів А, D₃, Е, С та глюконату цинку у формі ліпосомальної емульсії вірогідно ($P < 0,05$) знизилася активність СОД з одночасним значним (на 23,3-25,0 %) підвищенням активності ГПО і КАТ ($P < 0,01$), що вказує на високий рівень природної антиоксидантної здатності сперми баранів дослідної групи внаслідок зменшення руйнування мембран статевих клітин і вихід із них антиоксидантних ензимів.

Аналізом результатів досліджень підтверджено позитивну дію згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки баранам у період статевого спокою на якісні показники сперми після еквілібрації, кріоконсервування та розморожування. Зокрема, вірогідно підвищувалися показники рухливості спермій, виживання, активність СДГ і ЦО, а після деконсервування – ще й ензими антиоксидантного захисту є СОД, ГПО і КАТ, що вказує на посилення захисних властивостей статевих клітин у процесі низькотемпературного заморожування.

Важливим напрямом вивчення впливу додавання ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки до раціону баранів на якість сперми є дослідження кріорезистентності спермій, оскільки штучне осіменіння овець передбачає використання глибоко замороженої сперми. Аналізуючи якісні показники спермій баранів у процесі підготовки та кріоконсервації, встановлено певні закономірності. Так, активність свіжоотриманих спермій баранів дослідної групи була на 8,4 % більша порівняно з контрольною групою. Така ж картина збереглася і після еквілібрації, де активність спермій баранів дослідної групи була на 11,7 % вищою, ніж у контрольній групі.

Водночас, після розморожування різниця між активністю спермій баранів дослідної і контрольної групи стала ще вищою – 9,2 % ($P < 0,05$), що вказує на зменшення негативного впливу кріоконсервації за впливу вітамінів А, D₃, Е, С та глюконату цинку у формі ліпосомальної емульсії. Це призвело до підвищення показника стійкості спермій до заморожування, що виражається

відношенням активності гамет після розморожування до їх активності після еквілібрації, на 5,3 % порівняно з контрольною групою.

Таким чином, поєднання вітамінів А, D₃, Е та С з цинком глюконатом у складі ліпосомальної емульсії забезпечує пролонгований ефект, захищає діючі речовини під час проходження їх через травний тракт, активізує відтворювальну функцію баранів, як безпосередню дію цинку глюконату на синтез тестостерону, так і опосередковано — через стимуляцію гіпоталамо-гіпофізарної системи вітамінами А, D₃, Е, а також синтез стероїдних гормонів вітаміном С. Це дозволяє отримувати від баранів-плідників сперму високої якості у період статевого спокою і забезпечити плідотворне осіменіння вівцематок.

Широке використання сучасних репродуктивних біотехнологій, таких як штучне осіменіння (ШО), є важливим елементом підвищення генетичної цінності стад овець [185, 261]. У комерційних умовах штучне запліднення вимагає постійної наявності кріоконсервованої сперми від обраних тварин [262]. Під час процесу заморожування сперматозоїдів у спермі відбуваються численні ультраструктурні, біохімічні та функціональні зміни [182]. Плазма сперматозоїдів і акросоми особливо чутливі до впливу низьких температур, що викликає підвищення проникності клітинної мембрани та призводить до порушення морфології та рухливості сперматозоїдів [8, 9]. Кріопошкодження плазматичних мембран супроводжується витоком ферментів, у тому числі тих, які безпосередньо беруть участь у процесах запліднення. Крім того, руйнуються мітохондрії, основні енергогенеруючі органели сперматозоїдів [263]. Для забезпечення належного захисту сперматозоїдів від несприятливого впливу мінусових температур використовуються різноманітні розширювачі сперми, склад яких впливає на результати кріоконсервації [10].

Важливу роль у регуляції метаболічної активності сперматозоїдів відіграють мікроелементи, зокрема Zn, Mn, Cu. Ці елементи є кофакторами гліколітичних ферментів у мітохондріях, які забезпечують енергію для генерації антиоксидантного захисту та утилізації цитотоксичних метаболітів

[264]. Зокрема, Zn є активатором багатьох гліколітичних ферментів, а також пентозофосфатного шляху окислення глюкози, Cu модулює активність ферментів дихального ланцюга та різних протеїназ, а Mn регулює активність ферментів у циклі Кребса. Крім того, Cu, Zn і Mn є кофакторами супероксиддисмутази (SOD), яка пригнічує утворення активних форм кисню [265, 266]. Супероксиддисмутаза в спермі представлена у трьох різних ізоформах, які містять іони Mn^{2+} у мітохондріальному каталітичному центрі та Zn^{2+} та Cu^{2+} у цитоплазматичному та екзоклітинному компартментах відповідно [267, 268]. Кріотолерантність і здатність до запліднення статевих клітин залежать від активності СОД і відносного вмісту її ізоферментів. Система антиоксидантного ферментного захисту також включає каталазу сім'яної плазми і глутатіонпероксидазу [269]. Каталаза вибірково розкладає перекис водню і часто вважається єдиним поглиначем, який забезпечує повний антиоксидантний захист сперматозоїдів, а ГПО бере участь в інактивації реактивних метаболітів кисню, таких як перекис водню та органічні гідропероксида.

Використання замороженої та розмороженої сперми барана має першочергове значення в контрольованому розведенні овець [270]. Хімічний склад розріджувачів сперми, а також протоколи заморожування та розморожування можуть вплинути на успіх кріоконсервації сперми барана [271]. Для підтримання високої життєздатності сперми після розморожування до розріджувачів сперми додають мікроелементи. Проте кілька досліджень повідомляли про негативний вплив надлишку мікроелементів на якість сперми та здатність до запліднення після заморожування [245, 272]. Надмірна кількість деяких макро- та мікроелементів може порушувати функцію мітохондрій, що призводить до зниження рухливості сперми та потенціалу запліднення [273]. Таким чином, вплив нанорозмірних солей металів та інших типів наночастинок на якість сперматозоїдів ссавців широко вивчався протягом останніх кількох років [236-238].

Нанотехнологія є ключем до підвищення біодоступності та корисного впливу різноманітних біологічно активних речовин [239, 274, 275]. За останні два десятиліття вчені в Україні розробили унікальну технологію отримання нанокарбоксилатів макро- та мікроелементів, зокрема наносукцинатів та наноцитратів марганцю, цинку та міді [241, 239, 240]. Використання розріджувачів сперми з додаванням наносукцинату Mn^{2+} -, Zn^{2+} - або Cu^{2+} позитивно вплинуло на рухливість, виживання та запліднювальну здатність заморожено-розморожених спермійів бугая [17, 18]. Цікаво, що в той час як додавання низької дози Cu^{2+} -наносукцинату до розріджувача сперми мало помірний позитивний вплив на якість сперми бугая, використання вищих доз було пов'язане зі значним зниженням запліднювальної здатності сперми. Подібних досліджень зі спермою барана не проводилося.

У наших досліджуваннях вплив Mn^{2+} - і Zn^{2+} -наносукцинатів на рухливість сперматозоїдів барана виявився залежним від концентрацій, оскільки лише додавання 5,0 мкг/л наносукцинату до ЛЖТЦГС асоціювалося зі збільшенням рухливості спермійів після розморожування.

Очевидно, сукцинат, як компонент наносполуки і субстрат циклу трикарбонових кислот є додатковим джерелом для ресинтезу АТФ. Відповідно, проникнення субстрату в мітохондрії стимулює ресинтез АТФ, що зумовлює вищий рівень енергетичного забезпечення спермійів і проявляється підвищеною рухливістю статевих клітин, порівняно з контролем. Ймовірно 5,0 мкг/л наносукцинатів (Mn^{2+} - чи Zn^{2+} -) є оптимальною концентрацією, яка необхідна для стимулювання рухливості спермійів.

Навпаки, додавання найвищої дози Cu^{2+} -наносукцинату (3,75 мкг/л) значно знижувало рухливість сперматозоїдів барана, що узгоджується з попередніми результатами T. Leahy et al. (2016) [276], які продемонстрували, що надлишок Cu викликає аглютинацію спермійів через окиснення вільних сульфгідрильних груп до дисульфідних.

Також нашими дослідженнями встановлено, що додавання наносукцинату Mn і Zn у дозі 5,0 мкг/л до середовища для заморожування

сперми баранів вірогідно підвищує виживаність сперміїв, а додавання наносукцинату Cu у зростаючих дозах значно знижує час виживання, що підтверджує результати досліджень зі спермою бугаїв [18].

У наших дослідженнях додавання наносукцинату Mn і Zn у дозі 5,0 мкг/л до ЛЖТЦГС вірогідно підвищує активність ензимів-маркерів запліднювальної здатності СДГ і ЦО у сперміях баранів після деконсервування, а додавання наносукцинату Cu у зростаючих дозах значно знижує активність цих ензимів.

Додавання наносукцинату Mn і Zn у оптимальній дозі 5,0 мкг/л до середовища для кріоконсервування сперми баранів вірогідно підвищує активність деконсервованих сперміїв, їх виживаність, а також активність СДГ і ЦО в статевих клітинах одночасно значно знижує відсоток морфологічних порушень сперміїв баранів. Вища (2,5 мкг/л) та нижча (7,5 мкг/л) дози наносукцинату Mn і Zn суттєво не впливають на активність, виживаність сперміїв і активність СДГ і ЦО. Водночас, за додавання наносукцинату Cu у зростаючих дозах до ЛЖТЦГС знижує перелічені вище показники, що вказує на негативний вплив наночастинок цього мікроелемента.

Рухливість сперміїв є важливим компонентом репродуктивної здатності самців, оскільки вона є важливою для міграції в статевому тракті та взаємодії гамет для запліднення [277]. Саме здатність чоловічих клітин до активного руху дозволяє їм подолати анатомо-фізіологічні бар'єри жіночих статевих органів і запліднити яйцеклітину [278]. Оцінка рухливості сперміїв традиційним мікроскопічним методом є досить суб'єктивною [279] і не завжди корелює зі здатністю до запліднення [280]. Розроблений наприкінці двадцятого століття комп'ютерний аналіз сперміїв (CASA – Computer Assisted Sperm Analysis) дозволив отримати об'єктивний і точний підхід до оцінки рухливості статевих клітин. Технологія комп'ютерного аналізу сперми (CASA) точно й об'єктивно вимірює рухливість сперміїв за допомогою двовимірного відстеження руху головки сперми, що робить її популярним методом перевірки якості сперми в лабораторіях племінних центрів [281].

Дослідження взаємозв'язку між параметрами руху спермій, отриманими за допомогою системи CASA, і репродуктивною здатністю проводили у багатьох видів, включаючи баранів [282]. Кореляція між аналізом рухливості CASA та запліднювальною здатністю спермій досліджена менше на баранах порівняно з іншими видами тварин, і має різні результати. С.М. О'Меара et al. (2008) [202] повідомили про відсутність зв'язку між аналізом CASA спермій барана та репродуктивною здатністю статевих клітин. Проте, більшість авторів вказують на значну кореляцію параметрів рухливості CASA (включаючи відсоток рухомих спермій, VAP, VCL), а також зміни цих параметрів впродовж 6 годин інкубації з репродуктивною здатністю статевих клітин [283-285].

У нашому експерименті додавання наноцитрату Mn і Zn у дозі 5,0 мкг/л до середовища для заморожування сперми баранів вірогідно підвищувало кінематичні показники спермій VCL, VAP, VSL після деконсервування, збільшуючи водночас коефіцієнти рухливості LIN, STR і WOB. Додавання ж наноцитрату Cu у зростаючих дозах значно знижувало динамічні параметри спермій у розмороженій спермі баранів, одночасно знижуючи коефіцієнти рухливості.

Оскільки технологія CASA забезпечує об'єктивну оцінку рухливості спермій, а багато параметрів рухливості, які вона вимірює, за численними літературними даними пов'язані з високою фертильністю у баранів, то можна стверджувати, що додавання наноцитрату Mn і Zn у дозі 5,0 мкг/л до ЛЖТЦГС підвищує репродуктивну здатність статевих клітин баранів.

Для оцінки якості сперми важливо оцінити енергетичний обмін, оскільки рухливість спермій залежить від наявності енергії. Відомо, що аденозинтрифосфат (АТФ) слугує основним джерелом енергії, що використовується аксонемальними динеїновими АТФазами всередині хвостика спермія для індукції його руху [286]. АТФ у сперміях утворюється за допомогою комбінації метаболічних шляхів, включаючи окисне фосфорилування та цикл Кребса в мітохондріях середньої частини та гліколіз у головній частині джгутика. У процесі заморожування сперми виникають

кріопшкодження, які знижують рухливість сперміїв, що окремі автори [26] пояснюють порушенням функції мітохондрій.

Експериментально доведено, що спермії барана залежать головним чином від окисного фосфорилування для виробництва АТФ [287, 288]. У зв'язку з цим важливо провести оцінку стану окисного фосфорилування у сперміях як важливої для оцінки якості сперми баранів після кріоконсервування.

У результаті наших досліджень встановлено, що додавання наноцитрату Mn і Zn до середовища для кріоконсервування сперми баранів підвищує дихальну та інгібує відновну активність деконсервованої сперми з найбільшою вірогідністю за дози обох мікроелементів 5,0 мкг/л, що вказує на підвищення активності сперміїв. Додавання ж наноцитрату Cu проявляє протилежну дію на споживання кисню спермою баранів, знижуючи тим самим її якість. Подібні результати отримано авторами в експерименті з додаванням наносукцинатів Zn, Mn і Cu до лактозо-жовтково-гліцеринового середовища для кріоконсервування сперми бугаїв-плідників [17], що вказує на відсутність міжвидової різниці у дії наносполук досліджуваних металів.

Як заморожування, так і подальше розморожування зразків сперми призводять до структурних дефектів сперми [289, 290]. У нашому дослідженні в контрольній групі розмороженої сперми барана було 25,3% сперми з пошкодженими акросомами. Додавання Mn^{2+} - або Zn^{2+} -наносукцинату до ЛЖТЦГС загалом зменшувало відсоток сперміїв із пошкодженою акросомою, причому найменша частота пошкодження акросом спостерігалася при дозі 5,0 мкг/л., а найвища концентрація Cu^{2+} -наносукцинату була пов'язана з більшим ступенем пошкодження акросом.

Ймовірно, Mn^{2+} - і Zn^{2+} -наносукцинати в процесі розрідження і заморожування-розморожування сперми проникають через мембрани сперміїв, в тому числі й мітохондрій, а мікроелементи включаються в активні центри цитозольної і мітохондріальної СОД. Своєю чергою, активування СОД призводить до перетворення і зниження вмісту супероксиданіону. Однак, Cu^{2+} -наносукцинат, як компонент розріджувача сперми барана, у підвищених дозах

ймовірно стимулює процеси утворення вказаного цитотоксичного продукту (супероксиданіону), що своєю чергою активує СОД. Очевидно в спермі (сперміях) існує оптимум співвідношення мікроелементів (Zn^{2+}/Cu^{2+}) у складі наносукцинатів, вміст яких забезпечує баланс між швидкістю утворення і перетворення супероксиданіону. Крім того, підвищений вміст Cu^{2+} у складі наносукцинату, можливо, призводить до окиснення сульфгідрильних груп протеїнів й активних центрів ензимів. Вказані зміни можуть викликати порушення структурних зв'язків між ліпідними і протеїновими компонентами мембран, активувати процеси вільнорадикального окиснення ненасичених жирних кислот та призводити до руйнування мембран, зокрема, акросоми. Однак, подібні процеси протікають і під час капацитації спермій з характерними змінами в ділянці акросоми.

Сперма має ефективну ферментативну систему антиоксидантного захисту, яка нейтралізує надлишок активних форм кисню, що утворюються в процесі кріоконсервації [260]. У нашому експерименті додавання наносукцинатів мало подвійний вплив на активність антиоксидантних захисних ферментів.

За зниження активності СОД, на фоні доданих наносукцинатів, підвищувалась активність ГПО і КАТ, що може свідчити про зростання утворення H_2O_2 . Зокрема, підвищення активності ГПО може характеризувати помірне утворення пероксиду водню у розмороженій спермі. Водночас, підвищення активності КАТ може вказувати на надмірне утворення H_2O_2 внаслідок активування процесів пероксидного окиснення в спермі після розморожування. З іншого боку підвищена активність КАТ може вказувати на дефіцит H_2O_2 й активування пероксидазної реакції, за якої окиснюються субстрат і розкладається H_2O_2 .

Підсумовуючи, через різні ефекти додавання наносукцинатів Mn_{2+} , Zn_{2+} і Cu_{2+} на параметри сперми барана після розморожування варто продовжити дослідження, щоб пояснити їх вплив на метаболізм і виживання сперми барана під час процесу кріоконсервації. Mn_{2+} і Zn_{2+} -наносукцинати в дозі 5,0 мкг/л

мають найбільш сприятливий вплив на кінематику та структурну цілісність спермійв барана, тоді як Cu, як правило, має виснажливий вплив на характеристики сперми барана після розморожування.

Таким чином, додавання нанокитрату Mn і Zn у оптимальній дозі 5,0 мкг/л до середовища для кріоконсервування сперми баранів вірогідно підвищує активність деконсервованих спермійв, одночасно знижуючи морфологічні пошкодження статевих клітин, збільшує параметри руху (CASA), підвищує дихальну активність спермійв а також збільшує спермійв. Водночас, за додавання нанокитрату Cu у зростаючих дозах до ЛЖТЦГС знижуються перелічені вище показники (крім ушкоджень спермійв), що вказує на негативний вплив наночастинок цього мікроелемента.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі на основі комплексних андрологічних, лабораторних, біотехнологічних та морфологічних досліджень баранів і спермопродукції вивчено статеву активність та якісні параметри сперми за додавання до раціону плідників у період статевого спокою вітамінів А, D₃, Е, С і глюконату цинку у формі ліпосомальної емульсії. Експериментально обґрунтовано додавання наносукцинату і наноцитрату Mn, Zn Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів, що забезпечує підвищення якості та запліднювальної здатності деконсервованих спермій.

1. Встановлено, що згодовування баранам ліпосомальної добавки з вітамінами А, D₃, Е, С та цинку глюконатом у період статевого спокою підвищує концентрацію гемоглобіну, вміст еритроцитів та тромбоцитів, загального білка, холестеролу, глюкози та активність АЛТ і АСТ ($P<0,05-0,001$) на фоні підвищення вмісту лейкоцитів на 37,4 % ($P<0,05$), що вказує на посилення обмінних процесів та інтенсифікацію захисних сил в організмі плідників.

2. З'ясовано, що додавання комплексної ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки до раціону баранів у період статевого спокою активізувало їх статеву поведінку, що підтверджується вірогідним зростанням концентрації тестостерону у плазмі крові на 56,9 % ($P<0,01$) та зниженням кількості садок для отримання повноцінного еякуляту на 35,0 % ($P<0,05$).

3. Встановлено, що під впливом згодовування баранам вітамінів А, D₃, Е, С та цинку глюконату у формі ліпосомальної емульсії в період статевого спокою підвищується якість еякулятів: об'єм, концентрація спермій та загальна кількість спермій в еякуляті, а також їх виживання. У процесі кріоконсервування та розморожування сперми баранів зростають параметри рухливості VCL, VSL, VAP ($P<0,05-0,001$), активність ензимів – маркерів запліднювальної здатності спермій СДГ і ЦО ($P<0,01-0,001$), підвищується активність ГПО і КАТ ($P<0,05-0,01$) та знижується активність СОД ($P<0,05-0,01$).

4. Встановлено, що додавання наносукцинату та наноцитрату Mn і Zn в оптимальній дозі 5,0 мкг/л до ЛЖТЦГС підвищує активність сперміїв після деконсервування ($P<0,05-0,01$), їх кінетичні показники VCL, VSL, VAP ($P<0,01-0,001$), виживаність ($P<0,05-0,01$), знижує відсоток сперміїв з морфологічними порушеннями ($P<0,05-0,01$). За додавання ж наносукцинату Cu у зростаючих дозах значно знижується активність сперміїв у розмороженій спермі баранів із одночасним підвищенням відсотка дегенеративних сперміїв.

5. Експериментально доведено, що за додавання до ЛЖТЦГС наносукцинату та наноцитрату Mn і Zn у дозі 5,0 мкг/л підвищується активність СДГ ($P<0,01-0,001$) та ЦО ($P<0,05-0,01$) у сперміях після деконсервування, а додавання наносукцинату Cu у концентраціях 2,3 і 3,75 мкг/л значно знижує активність цих ензимів. Додавання наносукцинату і наноцитрату Mn і Zn до ЛЖТЦГС підвищує дихальну та знижує відновну активність деконсервованої сперми з найбільшою вірогідністю ($P<0,05$) за дози обох мікроелементів 5,0 мкг/л, що вказує на підвищення активності сперміїв, додавання ж наноцитрату Cu проявляє протилежну дію на споживання кисню спермою баранів, знижуючи тим самим її якість.

6. З'ясовано, що додавання наносукцинату та наноцитрату Mn і Zn до ЛЖТЦГС спричиняє інтенсифікацію активності ензимів антиоксидантного захисту у розморожених сперміях: зниження активності СОД ($P<0,05-0,01$) та підвищення активності ГПО ($P<0,05-0,01$) і КАТ ($P<0,05-0,01$), що вказує на їх вищу якість за оптимальної дози 0,5 мкг/л. Водночас, додавання наносполук Cu у концентраціях 2,3 і 3,75 мкг/л підвищує активність СОД ($P<0,05-0,01$) та знижує активність ГПО ($P<0,05-0,001$) і КАТ ($P<0,05-0,01$), що свідчить про зниження якості сперміїв.

РЕКОМЕНДАЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

З метою підвищення статеві активності та якості сперми баранів у період статевого спокою пропонується разом з комбікормом згодовувати вітаміни А, D₃, Е, С та цинку глюконату у формі ліпосомальної емульсії у дозі 2 мл на одну голову впродовж 45 діб.

Для підвищення якості деконсервованої сперми баранів рекомендується до складу лактозо-жовтково-трис-цитрато-гліцеринового середовища додавати наносукцинат або наноцитрат Mn і Zn у дозі 5,0 мкг/л.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Faigl V, Vass N, Jávör A, Kulcsár M, Solti L, Amiridis G, Cseh S. Artificial insemination of small ruminants — A review. *Acta Veterinaria Hungarica*. 2012; 60(1):115-29. <https://doi.org/10.1556/avet.2012.010>
2. Snowden GD, Stellflug JN, Van Vleck LD. Genetic correlation of ram sexual performance with ewe reproductive traits of four sheep breeds. *Applied Animal Behaviour Science*. 2004; 8(3-4): 253-261. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.04.004>
3. Gonçalves dos Santos SGC, Saraiva EP, Filho ECP, Damasceno dos Santos LFD, Fonsêca VFC, Veríssimo TNS, Almeida MEV, Pinheiro AC. Seasonal and circadian variation of the sexual behavior of Morada Nova rams in tropical environment. *R. Bras. Zootec.* 2015; 44(1): 8-14. <https://doi.org/10.1590/S1806-92902015000100002>
4. Довідник з повноцінної годівлі сільськогосподарських тварин / І.І. Ібатуллін, М.І. Бащенко, О.М. Жукорський та ін. ; НААН України, Ін-т тваринництва НААН, М-во аграрної політики України; ред. І.І. Ібатуллін, О.М. Жукорський. – Київ: Аграрна наука , 2016. – 300 с..
5. Santos SI, Sánchez-Dávila F, Armijo GFV, Ledezma-Torres RA, Bosque-González AS, Palomera CL, Bernal-Barragán H. Changes in Sexual Behaviour and Semen Quality Associated with Age and Type of Enclosure of Saint Croix Rams in Different Seasons of the Year. *Italian Journal of Animal Science*. 2015; 14(4): 678-683. doi: 10.4081/ijas.2015.3890
6. Гримак Х. Статева активність баранів-плідників залежно від способу їх використання. *Науковий вісник ЛНУ ветеринарної медицини та біотехнологій. Серія: Аграрні науки*. 2019; 21(91): 29-32. <https://doi.org/10.32718/nvlvet-a9105>
7. Ntemka A, Kiossis E, Boscós C, Theodoridis A, Kourousekos G, Tsakmakidis I. Impact of old age and season on Chios ram semen quality. *Small Ruminant Research*. 2019; 178: 15-17. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.07.004>

8. Salamon S and Maxwell WMC. Storage of Ram Semen. *Animal Reproduction Science*. 2000; 62: 77-111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X)
9. Gandini L, Lombardo F, Lenzi A, Spano M, Dondero F. Cryopreservation and Sperm DNA Integrity. *Cell Tissue Banking*. 2006; 7: 91–98. <https://doi.org/10.1007/s10561-005-0275-8>
10. 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. <https://doi.org/10.2754/avb200776030383>
11. Корнят С, Яремчук І, Андрушко О, Остапів Д, Шаран М, Чайковська О. Інтенсивність окисних процесів у спермі кнура за додавання наносукцинатів металів до середовища Екосперм. *Наук. техн. Бюл. Держ. наук. Контр. ін-ту вет. преп. і корм. добав.* 2019; 20(2): 352–357. DOI: 10.36359/scivp.2019-20-2.46.
12. 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
13. Каплуненко ВГ, Авдосьєва ІК, Пащенко АГ. Реальні перспективи використання досягнень нанотехнологій у ветеринарній практиці. *Науково-технічний вісник ДНДКІ ветеринарних препаратів і кормових добавок та Інституту біології тварин НААН*. 2014; 15(4): 252–260.
14. Сердюк А.М., Гуліч М.П., Каплуненко В.Г., Косінов М.В. Нанотехнології мікроелементів: проблеми, перспективи та шляхи усунення дефіциту макро- та мікроелементів. *Вісник Академії медичних наук*. 2010; 1: 107–114.
15. Іскра РЯ, Влізло ВВ, Федорук РС, Антоняк ГЛ. *Хром у годівлі тварин: монографія*. Київ: Аграрна наука. 2014; 312.
16. Влізло В, Бащенко М, Іскра Р, Федорук Р, Жукорський О, Мезенцева Л. Нанотехнології та їх застосування у тваринництві та ветеринарії. *Вісник агр. наук*. 2015; 93 (11): 5-9. DOI: 10.31073/agrovisnyk201511-01.

17. Яремчук І, Кузьміна Н, Остапів Д, Шаран М, Кава С. Інтенсивність та якість окислювальних процесів сперми бугаїв при додаванні мікроелементів наносукцинатних сполук. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. 2017;19(77): 185-189.
18. Корнят С, Шаран М, Остапів Д, Корбецький А, Яремчук І, Андрушко О. Якість деконсервованої сперми бугаїв за дії наносукцинатів Zn, Cu та Mn у розріджувачах. Біол. Тварин. 2021; 23 (1): 23-29. DOI: 10.15407/animbiol23.01.023.
19. Boussena S, Zaiter S, Aimeur R, Hireche S, Bouaziz O, Derqaoui L. Testicular and spermatoc performance in Ouled Djellal rams during the increasing of day length period. Archives of Applied Science Research. 2014; 6 (3): 102-107.
20. Misztal T. Melatonina — hormon sezonowości rozrodu u owiec. Postępy Nauk Rolniczych. 1996; 6: 43–58.
21. Wierzchoś E, Schwarz T. Specyfika regulacji rozrodu owiec i kóz. Biologia Rozrodu Zwierząt. Fizjologiczna regulacja procesów rozrodczych samicy /pod redakcją prof., T. Krzymowskiego// Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko–Mazurskiego w Olsztynie. 2007; 1: 491–504.
22. Amrane AA, Hammoudi SM, Belhamiti BT, Selles SMA, Benia AR, Kaidi R. Seasonal variation of plasma testosterone levels in Algerian male Arabia goats African Journal of biotechnology. 2013; 12 (48): 6784-6790.
23. Давиденко ВМ, Кот СП. Показники сперми баранів та її здатність переносити заморожування залежно від породи Вісник аграрної науки при Чорномор'я. 2010; 4 (57): 203–207.
24. Pascal C, Gilcă I, Răzvan RR, Nacu G. On the influence of certain natural factors on the sperm quality and sexual behaviour of rams. World Academy of Science, Engineering and Technology. 2010; 41: 717–720.
25. Mohamed SS, Abdelatif AM. Effect of level of feeding and season on thermoregulation and semen characteristics in Desert Rams. Global Veterinaria. 2012; 4 (3): 207-215.

26. Yahiya H, Yosef JA, Mahnaz AH. Monthly changes of testicular length, scrotal circumference and semen characteristics of dallagh ram in breeding and non breeding season. *Research on animal production*. 2012; 3 (5): 65-76.
27. Falah H, Al-Ghetaam K. Effect of environmental high temperature on the reproductive activity of awassi ram. *The Iraqi J. Vet. Med*. 2012; 36 (2): 244–253.
28. Benia AR, Taibi K, Ait-Amrane A, Belhamiti T, Hammoudi SM, Kaidi R. Study of seasonal sexual activity variations in Algerian rams: Sexual behaviour, testosterone concentration control and environmental factors. *African Journal of Biotechnology*. 2013; 12(41): 6042-6048.
29. Souri M, Mirmahmoudi R. Effect of season on dry matter intake and reproductive activity of merghoz buck goats in. *West of Iran Iranian Journal of Applied Animal Science*. 2014; 4(2): 317-323.
30. Moghaddam GH, Pourseif MM, Rafat SA. Seasonal variation in semen quantity and quality traits of Iranian crossbred rams. *Slovak J. Anim. Sci*. 2012; 45(3): 67-75.
31. Falavarjani K, Safdarian M, Hashemi M. Seasonal variation in semen characteristics. *Scrotal small ruminant research*. 2004; 53: 133-139.
32. Olah J, Kusza S, Harangi S, Posta J, Kovacs A, Pecsai A, Budai C, Javor A. Seasonal changes in scrotal circumference, the quantity and quality of ram semen in Hungary. *Archiv Tierzucht*. 2013; 56 (10): 102-108.
33. Давиденко ВМ, Шинкаренко ІС, Ігнатенко ОІ. Спермопродукція баранів асканійської тонкорунної породи залежно від сезонних і метеорологічних факторів. *Вівчарство Республіканський міжвідомчо–тематично науковий збірник*. 1979; 18: 94–100.
34. Casao A, Cebrián I, Asumpção ME, Pérez-Pé R, Abecia JA, Forcada F, Cebrián-Pérez JA, Muñio-Blanco T. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2010; 8: 59–68.

35. Kennaway DJ, Rowe SA. Melatonin binding sites and their role in seasonal reproduction. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1995; 49: 423–435.
36. Rosa HJD, Bryant MJ. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research.* 2003; 48: 155–171.
37. Molik E, Kalisz B, Matyja A. Wpływ długości dnia na zmiany sekrecji melatoniny i prolaktyny u owiec. *Wiadomości Zootechniczne, R. XLVII.* — 2009; 2: 13–17.
38. Egerszegi I, Sarlós P, Rátky J, Solti L, Faigl V, Kulcsár M, Cseh S. Effect of melatonin treatment on semen parameters and endocrine function in Black Racka rams out of the breeding season. *Small Ruminant Research.* 2014; 116 (2-3): 192-198.
39. Azawi OI, Ismaeel MA. Effects of Seasons on Some Semen Parameters and Bacterial Contamination of Awassi ram Semen. *Reprod. Dom. Anim.* 2012; 47: 403–406.
40. D'Alessandro AG, Martemucci G. Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram. *Animal Reproduction Science.* 2003; 79: 93–102.
41. Martia JI, Aparicio IM, Leal CLV, Garcia–Herreros M. Seasonal dynamics of sperm morphometric subpopulations and its association with sperm quality parameters in ram ejaculates. *Theriogenology.* 2012; 78:528–541.
42. Корінець Н, Болотов Ю. Ендогенні чинники та репродуктивність баранів—плідників. *Тваринництво України.* 2007; 9: 27–29.
43. Hassan MR, Pervage S, Ershaduzzaman M, Talukder MAI. Influence of age on the spermogrammic parameters of native sheep. *Bangladesh Agril. Univ.* 2009; 7(2): 301–304.
44. Gordon I. Controlled reproduction in sheep and goat. Dublin. 1997; 450 p.
45. Mitchel LM, Sieveira M, Ranila MJ, Rang ME. Effect of diet type and protein content on spontaneous and GnRH-induced LH secretion during the early postpartum period in Autumn-lambing ewes. *Abstr. Annu. Conf. Soc. Study Fert.* 1999; 23: 36-37.

46. Стапай ПВ, Макар ІА, Гавриляк ВВ, Параняк НМ, Лико ІЯ, Ткачук ВМ, Чокан ТВ, Седіло ГМ, Періг ДП, Мартищук МВ. Фізіологічно-біохімічні основи живлення овець. Львів: Лео-Бланк, 2007; 98 с.
47. Cheah Y, Yang W. Functions of essential nutrition for high quality spermatogenesis. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 2011; 2: 182-197.
48. Tufarelli V, Lacalandra GM, Aiudi G, Binetti F, Laudadio V. Influence of feeding level on live body weight and semen characteristics of Sardinian rams reared under intensive conditions. *Trop Anim Health Prod.* 2011; 43(2): 339-345.
49. Rao SBN, Dineshkumar D, Priyadarshini Chandrasekharaiah RM, Thulasi A, Lyju Jose V, Selvaraju S. Effect of three energy levels on body weight change, nutrient utilization, rumen biochemical profiles and semen quality in rams. *Indian Journal of Animal Sciences.* 2012; 82 (10): 1225-1229.
50. Vázquez-Armijo JF, Rojo R, López D, Tinoco JL, González A, Pescador N, Domínguez IA. Trace elements in sheep and goats reproduction: review. *Tropical and Subtropical Agroecosystems.* 2011; 14: 1-13.
51. Marzec-Wróblewska U, Kamiński P, Łakota P. Influence of chemical elements on mammalian spermatozoa. *Folia Biologica (Praha).* 2012; 58: 7-15.
52. Smith OB, Akinbamijo OO. Micronutrients and reproduction in farm animals. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 60-61: 549-560.
53. Куртяк БМ, Янович ВГ. Жиророзчинні вітаміни у ветеринарній медицині і тваринництві. Львів: Тріада плюс, 2004: 426 с.
54. Sönmez M, Tanyildizi S. The effect of ascorbic acid on semen hyaluronidase activity and sperm characteristics in rams. *Revue Méd. Vét.* 2008; 159 (1): 33-37.
55. Fazeli P, Zamiri MJ, Farshad A, Khalili B. Effects of vitamin C on testicular and seminal characteristics of Markhoz goats. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University.* 2010; 11 (3): 267-272.

56. Hailing L, Suyun G, Dubing Y, Leyan Y. Effect of vitamin E on the development of testis in sheep. *Artificial Insemination in Farm Animals*. 2011; 123–130.
57. Ross AC, Zolfaghari R. Regulation of hepatic retinol metabolism: perspectives from studies on vitamin A status. *The Journal of Nutrition*. 2004; 134 (1): 269–275. <https://doi.org/10.1093/jn/134.1.269s>.
58. Кошевой ВП, Федоренко СЯ, Науменко СВ, Иванченко ММ, Онищенко ОВ, Беседовська КС, Пастернак, Гладцінова ІО, Кошевой ВІ, Склярів ПМ, Малюкін ЮВ, Єфімова СЛ, Ключков ВК. Комплексні препарати, створені на основі нано-біоматеріалів та їх використання у ветеринарній репродуктології: метод. реком. Харків. держ. зоовет. акад. 2016.
59. Koriem KM, Arbid MS. Evaluating of β -carotene role in ameliorating of favism-induced disturbance in blood and testis. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*. 2018; 15 (3), 20170164, ISSN (Online) 1553–3840. <https://doi.org/10.1515/jcim-2017-0164>.
60. Sommer A, Vyas KS. A global clinical view on vitamin A and carotenoids. *The American journal of clinical nutrition*. 2012; 96 (5):1204S–6S. doi: 10.3945/ajcn.112.034868.
61. Wirth JP, Petry N, Tanumihardjo SA, Rogers LM, McLean E, Greig A, Garrett GS, Klemm RDW, Rohner F. Vitamin A supplementation programs and country-level evidence of vitamin A deficiency. *Nutrients*. 2017; 9 (3): E190. doi:10.3390/nu9030190
62. Кошевой ВП, Науменко СВ, Кошевой ВІ, Склярів ПМ, Малюкін ЮВ, Ключков ВК, Беспалова ІІ. Комплексний препарат «Карафанд+OV,Zn» та його використання гонадодистрофії у самців: метод. реком. Харків. держ. зоовет. акад. 2017.
63. Erkelens MN, Mebius RE. Retinoic acid and immune homeostasis: a balancing act. *Trends in Immunology*. 2017; 38 (3), 168–180. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.12.006>.

64. Gomez MEV, Varas S, Gimenezet MS. Model of Long-Term Vitamin A Deficiency in the Mammary Gland of Virgin Rats. Open Access Library Journal. 2017; 4 (09), 1–14. <https://doi.org/10.4236/oalib.1103887>.
65. Ghosh S, Adak K, Saha P, Upadhyay S, Ghosh A, Das P, Chatterjee A. Beta-carotene retention as retinol activity equivalent at different cooking and storage variants. International Food Research Journal. 2019; 26 (1), 355–361.
66. Ganguly J, Sastry PS. Mechanism of conversion of β -carotene into vitamin A – central cleavage versus random cleavage. In: Bourne, G. H. (Ed.). World Nutritional Determinants, Karger Publishers, Basel. 1985; 198–220. <https://doi.org/10.1159/000410268>.
67. Левченко ВІ. та ін. Результати диспансеризації бугаїв-плідників. Вісник Білоцерків.держ.аграр.ун-ту, 2000; 13 (2): 106–109.
68. Müller L, Bohm V. Antioxidant Activity of β -Carotene Compounds in Different in Vitro Assays. Molecules. 2011; 16 (2): 1055–1069. doi: 10.3390/molecules16021055
69. Al-Haboby AH, Abdulkareem TA, Alkass JE. Effect of vitamin A on testicular growth and spermatogenesis of Awassiram lambs. Dirasat. Agric. Sci. 1997a; 24: 16–26.
70. Al-Haboby AH, Abdulkareem TA, Alkass JE. Plasma testosterone and semen quality of Awassi rams as influenced by long term vitamin A shortage. Dirasat. Agric. Sci. 1997b; 24: 193–203
71. Coward DA, Howell McCJ, Pitt GA, Thompson JN. Effect of hormones on reproduction in rats fed a diet deficient in retinol (vitamin A alcohol) but containing methyl retinoate (vitamin A acid methyl ester). J. Reprod. Fertil. 1966; 12: 309–314.
72. Schmitt MC, Ong DE. Expression of cellular retinol-binding protein and lecithin-retinol acyltransferase in developing rat testis. Biol. Reprod. 1993; 49: 972–979.
73. Pappas RS, Newcomer ME, Ong DE. Endogenous retinoids in rat epididymal tissue and rat and human spermatozoa. Biol. Reprod. 1993; 48: 235–247.

74. Amann RP, Hammerstedt RH, Veeramachaneni DNR. The epididymis and sperm maturation: a prespective. *Reprod.Fertil. Dev.* 1993; 5: 361–381.
75. Vogler CJ, Bame JH, Delarnette JM, McGillard ML, Saacke RG. Effect of elevated testicular temperature on mor-phology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. *Theriogenology.* 1993; 40: 1207–1219.
76. Rajguru SU, Kang YH, Ahluwalia BS. Localization of retinol (vitamin A) in rat testes. *J. Nutr.* 1992; 112: 1881–1891.
77. Porter SB, Ong DE, Chytil F. Vitamin A status affects chromatin structure. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 1985; 56: 11–20.
78. Agarwal A. Role of oxidative stress in male infertility and antioxidant supplementation. *Business Briefing: Us Kidney & Urological Disease.* 2005; 122–124.
79. Bansal AK and Bilaspuri GS. Antioxidant effect of vitamin E on motility, viability an lipid peroxidation of cattle spermatozoa under oxidative stress. *Animal Science Papers and Reports* 2009; 27: 5–14.
80. Dobrescu O. Vitamin C addition to breeder diets increase turkey semen production. *Feedstuffs.* 1987; 59: 18.
81. Stocker R, Bowry VW, Frei B. Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1991; 88: 1646–1650.
82. Mukhopadhyay CK, Ghosh MK and Chatterjee IB. Ascorbic acid prevents lipid peroxidation and oxidative damage of proteins in guinea pig extrahepatic tissue microsomes. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 1995; 142: 71–78.
83. Degkwitz E. Some effects of vitamin C may be indirect, since it affects the blood levels of cortisol and thyroid hormonesa. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1987; 498 (1): 470–472.
84. Jacob RA. The integrated antioxidant system. *Nutrition research.* 1995; 15: 755–766.

85. Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA and Ames BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991; 88: 11003–11006.
86. Agarwal A and Sekhon LH. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Human Fertility*. 2010; 13: 217–225.
87. McDowell LLR. *Vitamins in animal and human nutrition*. Iowa State University. Press. Ames, IA. 2000; 20-80.
88. Nour M, Ghasemzadeh A, Farzadi L, Shahnazi V and Ghaffari Novin M. Vitamins C, E and lipid peroxidation levels in sperm and seminal plasma of asthenoteratozoospermic and normozoospermic men. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 2008; 6: 1–5.
89. Agarwal A and Prabakaran SA. Oxidative stress and antioxidants in male infertility: a difficult balance. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 2012; 3: 1–8.
90. Showell Mg, Brown J, Yazdani, Stankiewicz HR. Antioxidants for male subfertility (Review) summary of findings for the main comparion. *Clinical Research Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014; 12. doi: 10.1002/14651858.CD007411.pub3. Epub 2014 Dec 15.
91. Halliwell B, Gutteridge JMC. Antioxidant protection by low-molecular-mass agents: compounds derived from diet. In: *Free radicals in biology and medicine*. 3rd Ed. New York, USA: Oxford University Press, 1999; 200-219.
92. Nouri M, Ghasemzadeh A, Farzadi L, Shahnazi V, Ghaffari Novin M. Vitamins C, E and lipid peroxidation levels in sperm and seminal plasma of asthenoteratozoospermic and normozoospermic men. *Iranian J. Reprod. Med*. 2008; 6: 1-5.
93. Vatassery GT, Kresowky AM, Eckfeldt JH. Vitamin E concentration in human blood plasma and platelets. *Am. J. Clin. Nutr*. 1983; 37: 1020-1024.
94. Silva PFN. *Physiology of peroxidation process in mammalian sperm*. Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University. PhD Thesis. 2006; 178 pp.

95. Mason KE, Mauer SI. Reversible testis injury in the vitamin E-deficient hamster. *J. Nutr.* 1975; 105: 484-493.
96. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants, lipid peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993; 300: 535-43.
97. Budai C, Egerszegi I, Olah J, Javor A, Kovacs A. The protective effect of antioxidants on liquid and frozen stored ram semen – Review. *Anim. Sci. Biotech.* 2014; 47: 46-52.
98. Maxwell WMC, Stojanov T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod. Fert. Develop.* 1996; 32: 353-360.
99. Hughes CM, Lewis SE, Mckelvey-Martin VJ, Thompson W. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Hum. Reprod.* 1998; 13: 1240-1247.
100. Yue D, Yan L, Luo H, Xu X, Jin X. Effect of Vitamin E supplementation on semen quality and the testicular cell membranal and mitochondrial antioxidant abilities in Aohan fine-wool sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 2010; 118: 217-222.
101. Knight CA, Dutcher RA, Guerrant NB, Bechtel S. Destruction of ascorbic acid in the rumen of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 1941; 24: 567-577.
102. Hidiroglou M, Batra TR, Zhao X. Comparison of vitamin C bioavailability after multiple or single oral dosing of different formulations in sheep. *Reprod. Nutr. Dev.* 1977; 37: 443-448.
103. Parraguez VH, Atlagich M, Araneda O, García C, Muñoz A, De Los Reyes M, Urquieta, B. Effects of antioxidant vitamins on newborn and placental traits in gestations at high altitude: comparative study in high and low altitude native sheep. *Reprod. Fert. Dev.* 2011; 23: 285-296.
104. Hidiroglou M. Technical note: forms and route of vitamin C supplementation for cows. *J. Dairy Sci.* 1999; 82: 1831-1833.
105. Jafaroghli M, Abdi-Benemar H, Zamiri MJ, Khalili B, Farshad A, Shadparvar AA. Effects of dietary n-3 fatty acids and vitamin C on semen

- characteristics, lipid composition of sperm and blood metabolites in fat-tailed Moghani rams. *Anim. Reprod. Sci.* 2014; 147: 17-24.
106. Parraguez VH, Atlagich MA, Behn C, Bruzzone ME, Raggi LA. Fertility in ewes at high altitude: Comparison between animals with long- and shorttime residence at high altitude and the effect of antioxidants vitamins. *Reprod. Dom. Anim.* 2006; 41: 372.
 107. Marco-Jimenez F, Puchades S, Gadea J, Vicente JS, Viudes-De-Castro MP. Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenol.* 2005; 64: 1756-1765.
 108. Yan L, Liu J, Wu S, Zhang S, Ji G, Gu A. Seminal superoxide dismutase activity and its relationship with semen quality and SOD gene polymorphism. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2014; 3: 549-554.
 109. Khassaf M, Mcardle A, Esanu C, Vasilaki A, Mcardle F, Griffiths RD, Brodie DA, Jackson MJ. Effect of vitamin C supplements on antioxidant defense and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle. *J. Physiol.* 2003; 549 (2): 645-652.
 110. Cofré-Narbona EJ, Peralta-Troncoso OA, Urquieta-Mangiola BE, Raggi-Saini LA, Benavides-Aguila N, Parraguez-Gamboa VH. Improvement of antioxidant status and semen quality by oral supplementation with vitamins C and E in rams. *Revista Científica, FCV-LUZ.* 2016; XXVI (3): 156-163.
 111. Bucak MN, Tuncer PB, Sariözkan S and Ulutaş PA. Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. *Small Ruminant Research* 2009; 81: 13–17.
 112. Bucak MN, Sariözkan S, Tuncer PB, Sakin F, Ateşşahin A, Kulaksiz R and Çevik M. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research* 2010; 89: 24–30.
 113. Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, fertility, and development* 1995; 7: 659–668.

114. Halliwell B, Gutteridge JMG. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, USA. 2015; <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>
115. Kheradmand A, Babaei H and Batavani RA. Effect of improved diet on semen quality and scrotal circumference in the ram. *Veterinarski Arhiv*. 2006; 76: 333–341.
116. Amini Pour H, Tahmasbi AM and Naserain AA. The influence of vitamin E on semen characteristics of ghezel rams in during cooling and frozen process. *European Journal of Zoological Research* 2013; 2: 94–99.
117. Azawi OI and Hussein EK. Effect of vitamins C or E supplementation to Tris diluent on the semen quality of Awassi rams preserved at 5 °C. In *Veterinary Research Forum*. 2013; 4: 157-160.
118. Amidi F, Pazhohan A, Shabani Nashtaei M, Khodarahmian M, Nekoonam S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell and Tissue Banking*. 2016; 17: 745–756.
119. Ashrafi I, Kohram H, Naijian H, Bahareini M and Poorhamdollah M. Protective effect of melatonin on sperm motility parameters on liquid storage of ram semen at 5 °C. *African Journal of Biotechnology*. 2011; 10: 6670–6674.
120. Câmara DR, Mello-Pinto MMC, Pinto LC, Brasil OO, Nunes JF and Guerra MMP. Effects of reduced glutathione and catalase on the kinematics and membrane functionality of sperm during liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*. 2011; 100: 44–49.
121. Pomares CC, Stojanov T, Eppleston J and Maxwell WMC. Effect of glutathione peroxidase on the survival of goat and ram spermatozoa during liquid storage. In *Proceedings of the Seventh International Symposium on Spermatology*. 1994; 9: 24-28.
122. Stojanov T, Rhodes SL, Maxwell WMC, Evans G. The effect of antioxidants on the pregnancy rate after insemination with liquid stored ram spermatozoa. *Australian Society Reproductive. Biology*. 1994; 26: 116.

123. Silva SV, Soares AT, Batista AM, Almeida FC, Nunes JF, Peixoto CA and Guerra MMP. In vitro and in vivo evaluation of ram sperm frozen in tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione. *Reproduction in Domestic Animals*. 2011; 46: 874–881.
124. Paul RK, Kumar D and Naqvi SMK. Antioxidants protect proteins' anchorage to the bilayer by improving plasma membrane integrity of ram spermatozoa during liquid preservation in a soya lecithin-based diluent. *Reproduction in Domestic Animals*. 2017; 52: 1052–1060.
125. De Angelis C, Galdiero M, Pivonello C, Garifalos F, Menafrà D, Cariati F, Salzano C, Galdiero G, Piscopo M, Vece A, Colao A, Pivonello R. The role of vitamin D in male fertility: A focus on the testis. *Rev. Endocr. Metab. Disord*. 2017; 18 (3): 285-305. doi: 10.1007/s11154-017-9425-0.
126. Almujaideh MS. The Role of Dietary Nutrients in Male Infertility: A Review. *Life (Basel)*. 2023;13(2): 519. doi: 10.3390/life13020519.
127. Lerchbaum E, Obermayer-Pietsch B. Vitamin D and fertility: a systematic review. *Eur. J. Endocrinol*. 2012; 166 (5): 765-78. doi: 10.1530/EJE-11-0984. Epub 2012 Jan 24.
128. Boisen IM, Bøllehuus Hansen L, Mortensen LJ, Lanske B, Juul A, Blomberg Jensen M. Possible influence of vitamin D on male reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2017; 173: 215-222. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.09.023. Epub 2016 Sep 28.
129. Vickram S, Rohini K, Srinivasan S, Veenakumari DN, Archana K, Anbarasu K, Jeyanthi P, Thanigaivel S, Gulothungan G, Rajendiran, N. Role of Zinc (Zn) in Human Reproduction: A Journey from Initial Spermatogenesis to Childbirth. *Int. J. Mol. Sci*. 2021; 22: 2188.
130. Mirnamniha M, Faroughi F, Tahmasbpour E, Ebrahimi P, Harchegani AB. An overview on role of some trace elements in human reproductive health, sperm function and fertilization process. *Rev. Environ. Health*. 2019; 34: 339–348.
131. Allouche-Fitoussi D, Breitbart H. The Role of Zinc in Male Fertility. *Int. J. Mol. Sci*. 2020; 21: 7796.

132. Skalny AV, Aschner M, Tinkov AA. Zinc. *Adv. Food Nutr. Res.* 2021; 96: 251–310.
133. Zhao J, Dong X, Hu X, Long Z, Wang L, Liu Q, Sun B, Wang Q, Wu Q, Li L. Zinc levels in seminal plasma and their correlation with male infertility: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* 2016; 6: 22386.
134. Boran C, Ozkan KU. The effect of zinc therapy on damaged testis in pre-pubertal rats. *Pediatr. Surg. Int.* 2004; 20: 444–448.
135. Yan M, Hardin K, Ho E. Differential response to zinc-induced apoptosis in benign prostate hyperplasia and prostate cancer cells. *J. Nutr. Biochem.* 2010; 21: 687–694.
136. Hunt CD, Johnson PE, Herbel J, Mullen LK. Effects of dietary zinc depletion on seminal volume and zinc loss, serum testosterone concentrations, and sperm morphology in young men. *Am. J. Clin. Nutr.* 1992; 56: 148–157.
137. Ali H, Ahmed M, Baig M, Ali M. Relationship of zinc concentrations in blood and seminal plasma with various semen parameters in infertile subjects. *Pak. J. Med. Sci.* 2007; 23: 111–114.
138. Fallah A, Mohammad-Hasani A, Colagar AH. Zinc is an Essential Element for Male Fertility: A Review of Zn Roles in Men's Health, Germination, Sperm Quality, and Fertilization. *J. Reprod. Infertil.* 2018; 19: 69–81.
139. Foresta C, Garolla A, Cosci I, Menegazzo M, Ferigo M, Gandin V, De Toni L. Role of zinc trafficking in male fertility: From germ to sperm. *Hum. Reprod.* 2014; 29: 1134–1145.
140. Michailov Y, Ickowicz D, Breitbart H. Zn^{2+} -stimulation of sperm capacitation and of the acrosome reaction is mediated by EGFR activation. *Dev. Biol.* 2014; 396: 246–255.
141. Kerns K, Zigo M, Drobnis EZ, Sutovsky M, Sutovsky P. Zinc ion flux during mammalian sperm capacitation. *Nat. Commun.* 2018; 9: 2061.
142. Allouche-Fitoussi D, Bakhshi D, Breitbart H. Signaling pathways involved in human sperm hyperactivated motility stimulated by Zn^{2+} . *Mol. Reprod. Dev.* 2018; 85: 543–556.

143. Picco S, Anchordoquy JM, de Matos DG, Anchordoquy JP, Seoane A, Mattioli GA, Errecalde AL, Furnus CC. Effect of increasing zinc sulphate concentration during in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology* 2010; 74: 1141–1148.
144. Wooldridge LK, Nardi ME, Ealy AD. Zinc supplementation during in vitro embryo culture increases inner cell mass and total cell numbers in bovine blastocysts¹. *J. Anim. Sci.* 2019; 97: 4946–4950.
145. Kerns K, Zigo M, Sutovsky P. Zinc: A Necessary Ion for Mammalian Sperm Fertilization Competency. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19: 4097.
146. Chabchoub I, Nouioui MA, Araoud M, Mabrouk M, Amira D, Ben Aribia MH, Mahmoud K, Zhioua F, Merdassi G, Hedhili A. Effects of lead, cadmium, copper and zinc levels on the male reproductive function. *Andrologia*. 2021; 53: 14181.
147. Rodríguez-Díaz R, Blanes-Zamora R, Vaca-Sánchez R, Gómez-Rodríguez J, Hardisson A, González-Weller D, Gutiérrez J, Paz S, Rubio C, González-Dávila E. Influence of Seminal Metals on Assisted Reproduction Outcome. *Biol. Trace Elem. Res.* 2022; 1–15.
148. Hadwan MH, Almashhedy LA, Alsalman AR. Oral zinc supplementation restore high molecular weight seminal zinc binding protein to normal value in Iraqi infertile men. *BMC Urol.* 2012; 12: 32.
149. Fatima P, Hossain MM, Rahman D, Mugni CR, Sumon GM, Hossain HB, Hossain HN. Impact of Seminal Plasma Zinc and Serum Zinc Level on Semen Parameter of Fertile and Infertile Males. *J. Bangladesh Coll. Physicians Surg.* 2017; 35: 15–19.
150. Campanella L, Gatta T, Ravera O. Relationship between anti-oxidant capacity and manganese accumulation in the soft tissues of two freshwater molluscs: *Unio pictorum* *mancus* (Lamellibranchia, Unionidae) and *Viviparus ater* (Gastropoda, Prosobranchia). *J. Limnol.* 2005; 64: 153–158.
151. Coassin M, Ursini F, Bindoli A. Antioxidant effect of manganese. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992; 299: 330–333.

152. Cavallini L, Valente M, Bindoli A. On the mechanism of inhibition of lipid peroxidation by manganese. *Inorg. Chim. Acta* 1984; 91: 117–120.
153. Cheema RS, Bansal AK, Bilaspuri GS. Manganese Provides Antioxidant Protection for Sperm Cryopreservation that May Offer New Consideration for Clinical Fertility. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2009; 2: 152–159.
154. Barber SJ, Parker HM, McDaniel CD. Broiler breeder semen quality as affected by trace minerals in vitro. *Poult. Sci.* 2005; 84: 100–105.
155. Tajaddini S, Ebrahimi S, Behnam B, Bakhtiyari M, Joghataei MT, Abbasi M, Amini M, Amanpour S, Koruji M. Antioxidant effect of manganese on the testis structure and sperm parameters of formalin-treated mice. *Andrologia.* 2014; 46:246–253.
156. Chandra SV, Ara R, Nagar N, Seth PK. Sterility in experimental manganese toxicity. *Acta Biol. Med. Ger.* 1973; 30: 857–862.
157. Ponnappakkam TP, Bailey KS, Graves KA, Iszard MB. Assessment of male reproductive system in the CD-1 mice following oral manganese exposure. *Reprod. Toxicol.* 2003; 17: 547–551.
158. Armstrong CW, Moore LWJr, Hackler RL, Miller GB Jr, Stroube RB. An outbreak of metal fume fever. Diagnostic use of urinary copper and zinc determinations. *J. Occup. Med.* 1983; 25: 886–888.
159. Ellingsen DG, Moller LB, Aaseth J. *Handbook of the Toxicology of Metals*, 4th ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA. 2015.
160. Li Y, Gao Q, Li M, Li M, Gao X. Cadmium, Chromium, and Copper Concentration plus Semen-Quality in Environmental Pollution Site, China. *Iran J. Public Health.* 2014; 43: 35–41.
161. Mohammed SA, Bakery HH, Abuo Salem ME, Nabila AM, Elham AE. Toxicological effect of copper sulphate and cobalt chloride as feed additives on fertility in male albino rats. *Benha Vet. Med. J.* 2014; 27: 135–145.
162. Hardneck F, de Villiers C, Maree L. Effect of Copper Sulphate and Cadmium Chloride on Non-Human Primate Sperm Function In Vitro. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2021; 18: 6200.

163. Skandhan KP. Review on copper in male reproduction and contraception. *Rev. Fr. Gynecol. Obstet.* 1992; 87: 594–598.
164. Eidi M, Eidi A, Pouyan O, Shahmohammadi P, Fazaeli R, Bahar M. Seminal plasma level of copper and its relationship with seminal parameters. *Iran J. Reprod. Med.* 2010; 8: 60–65.
165. Chattopadhyay A, Sarkar M, Biswas NM. Dose-dependent effect of copper chloride on male reproductive function in immature rats. *Kathmandu Univ. Med. J.* 2005; 3: 392–400.
166. Cseh S, Faigl V and Amiridis GS. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Animal Reproduction Science.* 2012; 130: 187–192.
167. Leahy T and de Graaf SP. Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. *Reproduction in Domestic Animals.* 2012; 47: 207–213.
168. Martínez-Rodríguez C, Alvarez M, Ordás L, Chamorro CA, Martinez-Pastor F, Anel L and de Paz P. Evaluation of ram semen quality using polyacrylamide gel instead of cervical mucus in the sperm penetration test. *Theriogenology.* 2012; 77: 1575–1586.
169. Ferrusola O, González-Fernández L, Morrell JM, Sandoval CS. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction.* 2009; 138 (1): 55-63 DOI:10.1530/REP-08-0484
170. Aitken RJ and De Iuliis GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* 2009; 16: 3–13.
171. Wathes DC, Abayasekara DRE and Aitken RJ. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction1. *Biology of Reproduction* 2007; 77: 190–201.
172. Lenzi A, Gandini L, Lombardo F, Picardo M, Maresca V, Panfili E, Tramer F, Boitani C and Dondero F. Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and glutathione-dependent enzyme-PHGPx: From basic to clinic. *Contraception.* 2002; 65: 301–304.

173. Bucak MN and Tekin N. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research* 2007; 73: 103–108.
174. Sinclair S. Male infertility: nutritional and environmental considerations. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*. 2000; 5: 28–38.
175. Agarwal A, Makker K and Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2008; 59: 2–11.
176. Bansal AK and Bilaspuri GS. Oxidative stress alters membrane sulfhydryl status, lipid and phospholipid contents of crossbred cattle bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 2008; 104: 398–404.
177. Bucak MN, Başpınar N, Tuncer PB, Çoyan K, Sariözkan S, Akalin PP, Büyükleblebici S and Küçükğünay S. Effects of curcumin and dithioerythritol on frozen-thawed bovine semen. *Andrologia*. 2012; 44: 102–109.
178. Allai L, Benmoula A, Marciane da Silva M, Nasser B and El Amiri B. Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. *Animal Reproduction Science*. 2018; 192: 6–17.
179. Silva P. Physiology of peroxidation process in mammalian sperm. Doctoral dissertation, Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)–Utrecht University, Utrecht). 2006.
180. Aitken JB, Naumovski N, Curry B, Grupen CG, Gibb Z and Aitken RJ. Characterization of an L-amino acid oxidase in equine spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 2015b; 92: 1–13.
181. Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD and Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? *Theriogenology*. 2002; 57: 327–344.
182. Salamon S and Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*. 1995; 37: 185–249.

183. Evans G. and Maxwell WC. Salamons' artificial insemination of sheep and goats (No. Ed. 2). Butterworths. 1987; 194 pp. Soft back, 21.95. ISBN 0-409-49177-2.
184. Fiser PS, Ainsworth L and Fairfull RW. Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*. 1987; 28: 599–607.
185. Candappa IBR, Bartlewski PM. A review of advances in artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) in sheep, with the special reference to hormonal induction of cervical dilation and its implications for controlled animal reproduction and surgical techniques. *The Open Reproductive Science Journal*. 2011; 3: 162-175. <https://doi:10.2174/1874255601103010162>.
186. Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 2006; 63: 215–225.
187. Robertson L, Bailey JL and Buhr MM. Effects of cold shock and phospholipase A2 on intact boar spermatozoa and sperm head plasma membranes. *Molecular reproduction and development*. 1990; 26: 143-149.
188. Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW and Crowe JH. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology*. 1993; 265: 432-437.
189. Noiles EE, Bailey JL, and Storey BT. The temperature dependence in the hydraulic conductivity, LP, of the mouse sperm plasma membrane shows a discontinuity between 4 and 0 C. *Cryobiology*. 1995; 32: 220-238.
190. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 2000; 60: 481–492.
191. De Leeuw A.M, Den Daas, JHG and Woelders H. The fix vital stain method: simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. *Journal of Andrology*. 1991; 12: 112-118.

192. Gravance CG, Vishwanath R, Garner DL and Casry PJ. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *Journal of Andrology*. 1998; 19: 704-709.
193. Hinkovska-Galcheva V, Petkova D and Koumanov K. Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. *Cryobiology*, 1989; 26: 70-75.
194. Bailey JL and Buhr MM. Cryopreservation alters the Ca^{2+} flux of bovine spermatozoa. *Canadian Journal of Animal Science*. 1994; 74: 45-51.
195. McLaughlin EA and Ford WCL. Effects of cryopreservation on the intracellular calcium concentration of human spermatozoa and its response to progesterone. *Molecular reproduction and development*. 1994; 37: 241-246.
196. Trincherio GD, Affranchino MA, Schang LM and Beconi, MT. Antioxidant effect of bovine spermatozoa on lipid peroxidation. *Communications Biology*. 1990; 8: 339-350.
197. Fiser PS and Fairfull RW. The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology*. 1986; 23: 518–524.
198. Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD and Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? *Theriogenology*. 2002; 57: 327–344.
199. Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Dessole S and Nawroth F. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: From past practical difficulties to present success. *Reproductive BioMedicine Online* 2003; 6: 191–200.
200. Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J*. 2000; 41: 187-196.
201. Barbas JP and Mascarenhas R. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and tissue banking*. 2009; 10: 49–62.
202. O' Meara CM, Hanrahan JP, Prathalingam NS, Owen JS, Donovan A, Fair S, Ward F, Wade M, Evans ACO, Lonergan P. Relationship between in vitro

- sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology*. 2008; 69: 513–522. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.12.003>
203. Anel L, Kaabi M, Abroug B, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, De La Fuente LF and De Paz P. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churr ewes: A field assay. *Theriogenology*. 2005; 63: 1235–1247.
 204. Aisen E, Quintana M, Medina V, Morello H and Venturino A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*. 2005; 50: 239–249.
 205. Fair S, Hanrahan JP, O'Meara CM, Duffy P, Rizos D, Wade M, Donovan A, Boland MP, Lonergan P and Evans ACO. Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. *Theriogenology*. 2005; 63: 1995–2005.
 206. Paulenz H, Söderquist L, Ådnøy T, Soltun K, Sæther PA, Fjellsøy KR and Berg KA. Effect of cervical and vaginal insemination with liquid semen stored at room temperature on fertility of goats. *Animal Reproduction Science*. 2005; 86: 109–117.
 207. Bergeron A, Villemure M, Lazure C and Manjunath P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Molecular Reproduction and Development*. 2005; 71: 461–470.
 208. Meyers SA. Dry storage of sperm: Applications in primates and domestic animals. *Reproduction, Fertility and Development*. 2006; 18: 1–5.
 209. Oldenhof H, Friedel K, Sieme H, Glasmacher B and Wolkers WF. Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology*. 2010; 61: 115–122.
 210. Guthrie HD and Welch GR. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable

- boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *Journal of Animal Science*. 2006; 84: 2089–2100.
211. Maxwell WM, Evans G, Mortimer ST, Gillan L, Gellatly ES and McPhie CA. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reproduction, fertility, and development*. 1999; 11: 123–6.
 212. Muiño-Blanco T, Pérez-Pé R and Cebrián-Pérez JA. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reproduction in Domestic Animals*. 2008; 43: 18–31.
 213. Mann T. The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. London: Methuen and CO. LTD New York: John Wiley and sons, INC, 1964; 107.
 214. Ghaoui REH, Gillan L, Thomson PC, Evans G and Maxwell WMC. Effect of seminal plasma fractions from entire and vasectomized rams on the motility characteristics, membrane status, and in vitro fertility of ram spermatozoa. *Journal of Andrology*. 2007; 28: 109–122.
 215. Kafi A. Improving the quality of frozen-thawed ram semen. Doctoral thesis, Harper Adams University. 2019.
 216. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol. In Vitro*. 2005; 19: 975–983.
 217. Zhang S, Bian Z, Gu C, Zhang Y, He, S.; Gu N, Zhang J. Preparation of anti-human cardiac troponin I immunomagnetic nanoparticles and biological activity assays. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2007; 55: 143–148.
 218. Makhlef SB-D, Qasem R, Rubinstein S, Gedanken A, Breitbart H. Loading Magnetic Nanoparticles into Sperm Cells Does Not Affect Their Functionality. *Langmuir*. 2006; 22: 9480–9482.
 219. Kobyliak NM, Falalyeyeva TM, Kuryk OG, Beregova TV, Bodnar PM, Zholobak NM, Shcherbakov OB, Bubnov RV, Spivak MY. Antioxidative effects of cerium dioxide nanoparticles ameliorate age-related male infertility:

- Optimistic results in rats and the review of clinical clues for integrative concept of men health and fertility. *EPMA J.* 2015; 6: 12.
220. Falchi L, Galleri G, Dore GM, Zedda MT, Pau S, Bogliolo L, Ariu F, Pinna A, Nieddu S, Innocenzi P. Effect of exposure to CeO₂ nanoparticles on ram spermatozoa during storage at 4°C for 96 h. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2018; 16: 19.
 221. Pirmohamed T, Dowding JM, Singh S, Wasserman B, Heckert E, Karakoti AS, King JES, Seal S, Self WT. Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity. *Chem. Commun.* 2010; 46: 2736–2738.
 222. Kim J-W, Mahapatra C, Hong J-Y, Kim MS, Leong KW, Kim H-W, Hyun JK. Functional Recovery of Contused Spinal Cord in Rat with the Injection of Optimal-Dosed Cerium Oxide Nanoparticles. *Adv. Sci.* 2017; 4: 1700034.
 223. Singh R, Karakoti A, Self W, Seal S, Singh S. Redox-Sensitive Cerium Oxide Nanoparticles Protect Human Keratinocytes from Oxidative Stress Induced by Glutathione Depletion. *Langmuir* 2016; 32: 12202–12211.
 224. Nemmar A, Al-Salam S, Beegam S, Yuvaraju P, Ali BH. The acute pulmonary and thrombotic effects of cerium oxide nanoparticles after intratracheal instillation in mice. *Int. J. Nanomed.* 2017; 12: 2913–2922.
 225. Kumari M, Kumari SI, Kamal SSK, Grover P. Genotoxicity assessment of cerium oxide nanoparticles in female Wistar rats after acute oral exposure. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2014; 775–776: 7–19.
 226. Preaubert L, Courbiere B, Achard V, Tassistro V, Greco F, Orsiere T, Bottero J-Y, Rose J, Auffan M, Perrin J. Cerium dioxide nanoparticles affect in vitro fertilization in mice. *Nanotoxicology* 2016; 10: 111–117.
 227. Ariu F, Bogliolo L, Pinna A, Malfatti L, Innocenzi P, Falchi L, Bebbere D, Ledda S. Cerium oxide nanoparticles (CeO₂ NPs) improve the developmental competence of in vitro-matured prepubertal ovine oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.* 2017; 29: 1046.
 228. Jahanbin R, Yazdanshenas P, Rahimi M, Hajarizadeh A, Tvrdá E, Nazari SA, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Ghanem N. In Vivo and In Vitro Evaluation of

- Bull Semen Processed with Zinc (Zn) Nanoparticles. *Biol. Trace Elem. Res.* 2021; 199: 126–135.
229. Shi L, Xun W, Yue W, Zhang C, Ren Y, Shi L, Wang Q, Yang R, Lei F. Effect of sodium selenite, Se-yeast and nano-elemental selenium on growth performance, Se concentration and antioxidant status in growing male goats. *Small Rumin. Res.* 2011; 96: 49–52.
 230. Shi L-G, Yang R-J, Yue W-B, Xun W-J, Zhang C-X, Ren Y-S, Shi L, Lei F-L. Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats. *Anim. Reprod. Sci.* 2010; 118: 248–254.
 231. Caldeira DF, Paulini F, Silva RC, de Azevedo RB, Lucci CM. In vitro exposure of bull sperm cells to DMSA-coated maghemite nanoparticles does not affect cell functionality or structure. *Int. J. Hyperth.* 2018; 34: 415–422.
 232. Hamam ET, Awadalla A, Shokeir AA, Aboul-Naga AM. Zinc oxide nanoparticles attenuate prepubertal exposure to cisplatin-induced testicular toxicity and spermatogenesis impairment in rats. *Toxicology* 2022; 468: 153102.
 233. Kad A, Pundir A, Arya SK, Puri S, Khatri M. Meta-analysis of in-vitro cytotoxicity evaluation studies of zinc oxide nanoparticles: Paving way for safer innovations. *Toxicol. In Vitro.* 2022; 83: 105418.
 234. Fadl A, Abdelnaby E, El-seadawy I, Kotp M, Abo El-Maaty AM, El-Sherbiny H. Eco-friendly Synthesized Zinc Oxide Nanoparticles Improved Frozen-thawed Semen Quality and Antioxidant Capacity of Rams. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 2022; 12(3), 259-264. Retrieved from <https://www.advetresearch.com/index.php/AVR/article/view/926>
 235. Kielbik P, Kaszewski J, Dabrowski S, Faundez R, Witkowski BS, Wachnicki L, Zhydachevskyy Y, Sapierzynski R, Gajewski Z, Godlewski M, Godlewski MM. Transfer of orally administered ZnO:Eu nanoparticles through the blood-testis barrier: the effect on kinetic sperm parameters and apoptosis in

- mice testes. *Nanotechnology*. 2019; 30 (45): 455101. doi: 10.1088/1361-6528/ab36f4. Epub 2019 Jul 30.
236. 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.
 237. Khalil W, El-Harairy 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.
 238. Iftikhar M, Noureen 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.
 239. Борисевич ВБ, Каплуненко ВГ, Косінов МВ. Наноматеріали в біології. Основи нановетеринарії: Авіценна, 2010; 416 стор.
 240. Гуліч МП, Ємченко НЛ, Харченко ОО, Ященко ОВ, Томашевська ЛА, Антомонов МІ. Продукти нанотехнологій: цитрати біоелементів (хімічні характеристики, біологічна дія, сфера застосування). Київ: Медінформ, 2018; 202 с.
 241. Косінов МВ, Каплуненко ВГ. Спосіб отримання карбоксилатів металів «Нанотехнологія отримання карбоксилатів металів». Патент України №38391. опубл. 12.01.2009. Бюл. № 1, 2009 стор. Доступно за адресою: <https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=128062>
 242. Gupta A, Kumar A, Naqvi S, Flora SJS. Chronic exposure to multi-metals on testicular toxicity in rats. *Toxicol. Mech. Methods* 2021; 31: 53–66.
 243. Яремчук ІМ, Шаран ММ. Сучасні можливості аналізу якості сперми та розрахунку дози сперми. *Біологія тварин.* 2012; 14 (1-2): 697-703.
 244. Влізло ВВ (ред.), Федорук РС, Ратич ІБ. Лабораторні методи дослідження в біології, тваринництві та ветеринарії. Довідник. Львів, 2012; 764 с.

245. 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.
<http://doi.org/10.3109/19396360903582216>.
246. <https://biz.nv.ua/ukr/markets/vivci-za-28-rokiv-pogoliv-ya-v-ukrajini-skorotilosya-v-dev-yat-raziv-50029872.html>
247. <https://agronews.ua/news/v-ukrayini-suttyevo-zbilshylosya-pogolivya-ovecz-ta-kiz>
248. <http://www.ulus.cz/Texel.html>
249. Ібатуллін ІІ, Пабат ВО, Туринський ВМ. Стан та шляхи підвищення експортного потенціалу галузі вівчарства України. *Наук. Вісн. Нац. У-ту біоресурсів і природокористування України. Серія: Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва.* 2016; 236: 30-45.
Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvnau_tevppt_2016_236_6
250. Abdulkareema TA, Al-Habobyb AH, Al-Mjameia SM, Hobi AA. Sperm abnormalities associated with vitamin A deficiency in rams. *Small Ruminant Research.* 2005; 57: 67–71.
251. Angelis C, Galdiero M, Pivonello C, Garifalos F, Menafrà D, Cariati F, Salzano C, Galdiero G, Piscopo M, Vece A, Colao A, Pivonello R. The role of vitamin D in male fertility: A focus on the testis. *Rev Endocr. Metab. Disord.* 2017; 18(3): 285-305. <http://doi: 10.1007/s11154-017-9425-0>
252. Baiomy AA, Mohamed AEA, Mottelib AA. Effect of dietary selenium and vitamin E supplementation on productive and reproductive performance in rams. *BS. Vet. Med. J.* 2009; 19 (1): 39-43.
<http://doi:10.21608/jvmr.2009.77807256>
253. Hisham A. Shedeed Evaluating the effect of adding vitamins E & C to the extender for Barki ram semen by cooling. *International Journal of Environment. Agriculture and Biotechnology.* 2020; 5(2): 356-365.
<https://dx.doi.org/10.22161/ijeab.52.10>

254. Cheah Y, Yang W. Functions of essential nutrition for high quality spermatogenesis. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2011; 2: 182-197. <https://doi:10.4236/abb.2011.24029>
255. Allouche-Fitoussi D, Breitbart H. The Role of Zinc in Male Fertility. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21 (20): 7796. <https://doi.org/10.3390/ijms21207796>
256. Page CM, Van Emon ML, Murphy TW, Larson CK, Berardinelli JG, McGregor IR, J.B.Taylor, W.C.Stewart Effects of zinc source and dietary concentration on serum zinc concentrations, growth performance, wool and reproductive characteristics in developing rams. *Animal*. 2020; 14(3): 520–528. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002180>
257. Fadl AM, Abdelnaby EA, El-Sherbiny HR. Supplemental dietary zinc sulphate and folic acid combination improves testicular volume and haemodynamics, testosterone levels and semen quality in rams under heat stress conditions. *Reprod Domest Anim*. 2022; 57(6): 567-576. <https://doi:10.1111/rda.14096>
258. Ghorbani A, Moeini MM, Souri M, Hajarian H. Influences of dietary selenium, zinc and their combination on semen characteristics and testosterone concentration in mature rams during breeding season. *Journal of Applied Animal Research*. 2018; 46 (1): 813–819. <https://doi.org/10.1080/09712119.2017.1406858>
259. Остапів ДД. Окисно-відновні процеси в статевих клітинах бугаїв і корів, методи оцінки якості та підвищення плодючості. 2007; 359 арк.: іл. - арк. 280-359 укр.
260. Ford WC. Regulation of sperm function by reactive oxygen species // *Human reproduction*. 2004; 10 (5): 387–399. <http://doi:10.1093/humupd/dmh034>
261. Alvarez M, Anel-Lopez L, Boixo JC, Chamorro C, Neila-Montero M, Montes-Garrido R, de Paz P, Anel L. Current Challenges in Sheep Artificial Insemination: A Particular Insight. *Reprod. Domest. Anim*. 2019; 54:32–40.
262. Nagata MPB, Egashira J, Katafuchi N, Endo K, Ogata K, Yamanaka K, Yamanouchi T, Matsuda H, Hashiyada Y, Yamashita K. Bovine Sperm

- Selection Procedure Prior to Cryopreservation for Improvement of Post-Thawed Semen Quality and Fertility. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 2019; 10: 1–14.
263. Рокотянська ВО. Вплив наноаквахелатів на біологічну якість сперми. *Вісник аграрної науки Причорномор'я.* 2018; 3: 56-60. [http://doi:10.31521/2313-092X/2018-3\(99\)](http://doi:10.31521/2313-092X/2018-3(99))
264. 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.
265. Eghbali M, Alavi-Shoushtari SM, Rezaii SA. Effects of copper and superoxide dismutase content of seminal plasma on buffalo semen characteristics. *Pak. J. Biol. Sci.* 2008; 11: 1964–1968.
266. Кузьміна Н, Остапів Д, Гулюк Н, Гуменецький І. Активність і вміст ізоформ СОД в чоловічих еякулятах і виживання сперматозоїдів. *Вісник Львівського нац. ун-т імені Івана Франка. Серія біол.* 2012; 59: 44–51. <http://publications.lnu.edu.ua/bulletins/index.php/biology/article/view/8506>
267. Skrzycki IM, Czeczot H. Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) – structure, properties and functions. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2004; 24(58): 301–311.
268. Кузьміна НВ, Остапів ДД. Ізоферменти СОД в розведених еякулятах бугаїв. *Розведення і генетика тварин.* 2010; 44: 107–108.
269. Papas M, Catalan J, Barranco I, Arroyo L, Bassols A, Yeste M, Miry J. Total and specific activities of superoxide dismutase (SOD) in seminal plasma are related with the cryotolerance of jackass spermatozoa. *Cryobiology.* 2020; 92: 109-116. <http://doi:10.1016/j.cryobiol.2019.11.043>.
270. Benson JD, Woods EJ, Walters EM, Critser JK. The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology.* 2012; 78 (8):1682–1699. <http://doi:10.1016/j.theriogenology.2012.06.007>.
271. Tekin N, Uysal O, Akcay E, Yavas I. Effects of different taurine doses and freezing rate on freezing of row semen. *Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi.* 2006; 53.

272. 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.
273. Nakada K, Sato A, Yoshida K, Morita T, Tanaka H, Inoue SI, Yonekawa H, Hayashi JJ. Mitochondria-related male infertility. *PNAS.* 2006; 103 (41): 15148–15153. DOI: 10.1073/pnas.0604641103.
274. Ali A, Ijaz M, Khan YR, Sajid HA, Hussain K, Rabbani AH, Shahid M, Naseer O, Ghaffar A, Naeem MA, Zafar MZ, Malik AI, Ahmed I. Role of nanotechnology in animal production and veterinary medicine. *Trop. Anim. Health Prod.* 2021; 53 (5): 508. DOI: 10.1007/s11250-021-02951-5.
275. Kareem EH, Dawood TN, Al-Samarai FR. Application of nanoparticle in the veterinary medicine. *Magna Scientia Adv. Res. Rev.* 2022; 4 (1): 27–38. DOI: 10.30574/msarr.2022.4.1.0082.
276. 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.
277. Palacín S, Vicente-Fiel P, Santolaria J. Yániz Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram. *Small Ruminant Research.* 2012; 112 (1–3): 128–135 DOI: 10.1016/j.smallrumres.
278. Suarez SS & Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update.* 2006; 12: 23-37. doi: 10.1093/HUMUPD/DMI047
279. Singh A, Kumar A, & Bisla A. Computer-assisted sperm analysis (CASA) in veterinary science: A review. *The Indian Journal of Animal Sciences.* 2021; 91: 419-429.
280. Piddubna L, Zakharchuk D, Bratushka R & Ivanytska V. Interrelation of kinetic parameters of sperm of servicing bulls of the Holstein breed with its fertilising ability. *Scientific Horizons.* 2022; 25 (8): 67-74. DOI:10.48077/scihor.25(8).2022.67-74

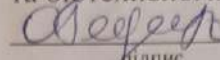
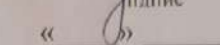
281. Van de Hoek M, Rickard JP, de Graaf SP. Motility Assessment of Ram Spermatozoa. *Biology*. 2022; 11: 715. <https://doi.org/10.3390/biology11121715>
282. Yániz JL, Silvestre MA, Santolaria P, Soler C. CASA-Mot in mammals: An update. *Reprod. Fertil. Dev.* 2018; 30: 799–809. doi: 10.1071/RD17432
283. Smith JF, Parr J, Murray GR, Clarke A, McDonald RM, Duganzich DM. Relationships between Laboratory Measures of Ram Sperm Competence and Field Fertility; New Zealand Society of Animal Production: Hamilton, New Zealand. 1998; 181–185. doi: 10.3310/hta9100
284. Del Olmo E, Bisbal A, Maroto-Morales A, García-Alvarez O, Ramon M, Jimenez-Rabadan P, Martínez-Pastor F, Soler AJ, Garde JJ, Fernandez-Santos M.R. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. *Anim. Reprod. Sci.* 2013; 138: 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.02.007>
285. Vicente-Fiel S, Palacín I, Santolaria P, Fantova E, Quintín-Casorrán FJ, Sevilla-Mur E, Yániz JL. In vitro assessment of sperm quality from rams of high and low field fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 2014; 146: 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.02.005>
286. Freitas MJ, Vijayaraghavan S, Fardilha M. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biol. Reprod.* 2016; 96: 2–12. DOI: 10.1095/biolreprod.116.144337
287. Gibb Z, Griffin RA, Aitken RJ, De Iuliis GN. Functions and effects of reactive oxygen species in male fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 2020; 220, 106456. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106456>
288. Gibb Z, Lambourne SR, Aitken RJ. The Paradoxical Relationship Between Stallion Fertility and Oxidative Stress1. *Biol. Reprod.* 2014; 91: 77. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.118539>
289. O'Connell M, McClure N, and Lewis SEM. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*, 2002; 17 (3): 704–709.

290. Nur Z, Zik B, Ustuner B, Sagirkaya H, and Ozguden CG. Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology*, 2010; 73 (9): 1267–1275.

ДОДАТОК А

Затверджую

Проректор з наукової роботи
Львівського національного
університету ветеринарної медицини
та біотехнологій ім. С. З. Гжицького

 Федеч О.М.
підпис прізвище, ініціали
«» 2023 р.
М.П.

А К Т

про впровадження / використання результатів
кандидатської дисертаційної роботи у навчальний процес

Цим актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «Кількісні та якісні параметри сперми баранів за використання вітамінів А, D₃, Е, С і наночастинок Мангану, Цинку і Купруму», що подана на здобуття наукового ступеня доктора філософією за спеціальністю 211 – Ветеринарна медицина, виконана Шаран Ольгою Миколаївною впроваджено у навчальні програми дисципліни

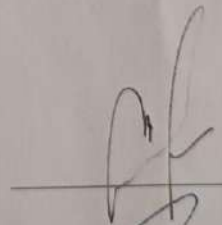
«Акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин».

Назва дисципліни

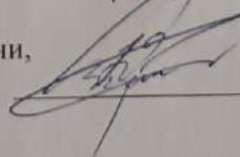
Результати дисертаційної роботи Шаран Ольги Миколаївни щодо методів підвищення статевої активності, якісних параметрів сперми баранів згодовуванням вітамінів А, D₃, Е, С використовуються під час читання лекцій, проведення лабораторних занять, а також під час проведення наукових досліджень на кафедрі акушерства, гінекології та біотехнології відтворення тварин імені Г.В. Звервої Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького у підготовці фахівців ОС «Магістр» (галузь знань 21 – Ветеринарна медицина, спеціальність 211 – Ветеринарна медицина).

Протокол засідання кафедри № 9 від 15 червня 2023.

Завідувач кафедри акушерства,
гінекології та біотехнології відтворення
тварин імені Г.В. Звервої,
д.вет.н., професор

 Стефаник В.Ю.

Декан факультету ветеринарної медицини,
к. вет. н., доцент

 Стронський Ю.С.

ДОДАТОК Б



ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ Б



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **153959** (13) **U**
 (51) МПК (2023.01)
A61D 19/00
A61K 45/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
 ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
 ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
 "УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
 ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
 ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2022 03363	(72) Винахідник(и):
(22) Дата подання заявки: 13.09.2022	(73) Володілець (володільці):
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 28.09.2023	ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 27.09.2023, Бюл.№ 39	НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ,
	вул. В. Стуса, 38, м. Львів-34, 79034 (UA)

(54) СПОСІБ ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ СТАТЕВОЇ АКТИВНОСТІ ТА СПЕРМАТОГЕНЕЗУ У БАРАНІВ**(57) Реферат:**

Спосіб стимуляції статевої активності та сперматогенезу у баранів включає згодовування баранам-плідникам впродовж 45 днів з комбікормом ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки у дозі 2 мл на голову на добу.

UA 153959 U

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ Б

UA 153959 U

Корисна модель належить до сільського господарства, зокрема до вівчарства, а саме до способів поліпшення спермопродуктивності баранів-плідників. Корисна модель використана для стимуляції спермопродуктивності баранів, підвищення їх статевої активності та запліднювальної здатності спермій в господарствах, де вирощують та розводять овець.

Відомі способи стимуляції спермопродуктивності у бугаїв-плідників та кнурів-плідників. Зокрема, відомий спосіб стимуляції спермопродуктивності кнурів-плідників [Патент України на корисну модель 47715. Спосіб стимуляції спермопродуктивності кнурів-плідників. Опубл. 25.02.2010. Бюл. 4], що включає згодовування біологічно активних речовин, а саме препарату Янтаргін кнурам-плідникам впродовж сорока днів через день разом з основним кормом.

Найближчим аналогом корисної моделі є спосіб поліпшення спермопродуктивності бугаїв-плідників [Патент на винахід 77582 Україна. Спосіб поліпшення спермопродуктивності бугаїв-плідників 15.12.2006. Бюл. 12], який передбачає використання преміксу, що містить мікроелементи цинк, мідь, марганець, кобальт, йод, вітаміни А, D, Е і висівки пшеничні як наповнювач. Недоліком цього способу є використання солей мікроелементів, засвоєння яких в організмі плідників є невисоким.

Спільними ознаками між найближчого аналога і корисної моделі є використання вітамінів А, D₃, Е, а також згодовування кормової добавки з комбікормом.

Корисна модель усуває недоліки найближчого аналога застосуванням органічної форми цинку - глюконату, а також створенням добавки у формі ліпосомальної емульсії. Заявлений спосіб дає можливість підвищити статеву активність баранів, покращити якість сперми та збільшити кількість спермодоз у період статевого спокою.

Вказаного ефекту досягається за рахунок оптимальної комбінації компонентів та форми кормової добавки, згодовування якої впродовж циклу сперматогенезу забезпечує пролонгований ефект, захищає діючі речовини під час проходження їх через травний тракт, активізує відтворювальну функцію баранів, як безпосередню дію глюконату цинку на синтез тестостерону, так і опосередковано - через стимуляцію гіпоталамо-гіпофізарної системи вітамінами А, D₃, Е, а також синтез стероїдних гормонів вітаміном С.

В основу корисної моделі поставлена задача підвищити статеву активність та сперматогенез у баранів-плідників у період статевого спокою, збільшити вихід спермодоз з еякуляту без викликання емоційно-больового стресу та значних затрат праці.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі стимуляції статевої активності та сперматогенезу у баранів, який включає згодовування біологічно активних речовин, згідно з корисною моделлю, баранам-плідникам впродовж 45 днів з комбікормом згодовують ліпосомальну вітамінно-мінеральну добавку у дозі 2 мл на голову на добу, у наступному співвідношенні компонентів на 20 мл препарату:

вітамін А	250000-500000 МО
вітамін D ₃	25000-50000 МО
вітамін Е	250-500 мг
вітамін С	500-800 мг
глюконат цинку	200-350 мг
олія соняшникова рафінована	2,0-2,5 мл
лецитин	0,2-0,3 г
твін-20	0,01-0,015 мл
дистильована вода до	20,0 мл.

У складі кормової добавки містяться вітаміни А, D₃, Е, С і глюконат цинку у формі ліпосомальної емульсії. Біологічно активні компоненти ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки здійснюють комплексний вплив на відтворну здатність баранів, активізуючи на різних рівнях систему "гіпоталамус-гіпофіз-сім'яники" та одночасно слугують природним джерелом метаболітів, необхідних для синтезу чоловічих статевих клітин.

Ефективність способу ґрунтується на згодовуванні баранам-плідникам ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки з оптимальним співвідношенням його складових. Під час проведення патентно-інформаційного пошуку знайдено технічне рішення, в якому є ряд суттєвих ознак, спільних із заявленим: використання вітамінів А, D₃, Е, а також форма препарату - ліпосомальна емульсія.

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ Б

UA 153959 U

Корисна модель може бути використана у селекційно-генетичних центрах і пунктах штучного осіменіння овець різної форми власності, що здійснюють свою діяльність для виробництва високоякісної спермопродукції, фасування та її зберігання.

Складові компоненти препарату забезпечують:

5 1. Вітамін А бере участь в окисно-відновних реакціях. Гальмуючи активність інсуліну, він впливає на вуглеводний і жировий обмін; активізує метаболізм кальцію і магнію, входить до складу ліпідного шару клітинних мембран.

2. Вітамін D₃ відіграє провідну роль в обміні кальцію і фосфору, починаючи з моменту всмоктування з кишечника, закінчуючи виведенням з організму тварин, впливає на формування та розвиток скелету.

10 3. Вітамін Е, як антиоксидант, запобігає окисненню жирних кислот, забезпечує стійкість і активність епітелію слизових оболонок статеві системи, травного каналу і кон'юнктиви.

Спільно вітаміни А, D₃ та Е підвищують загальну резистентність організму тварин, покращують їх стан, зміцнюють загальний стан організму.

15 4. Вітамін С - потужний антиоксидант, що відіграє значну роль у регуляції окиснювально-відновних процесів, активує синтез колагену і проколагену, стероїдних гормонів і катехоламінів, обмін фолієвої кислоти та феруму. Регулює процес згортання крові, нормалізує проникність капілярів, необхідний для кровотворення, забезпечує протизапальну і протиалергічну дію.

20 5. Глюконат цинку - це цинкова сіль глюконової кислоти, що складається з двох аніонів глюконату для кожного катіону цинку (II). Глюконат цинку - популярна форма доставки цинку як харчової добавки, що забезпечує 14,35 % елементарного цинку за масою. Одна з основних функцій біологічно активної добавки - участь у синтезі тестостерону та інсуліну.

25 6. Олія соняшникова рафінована містить лінолеву, олеїнову, пальмітинову, стеаринову, міристинову, ліноленову та архаїнову жирні кислоти. Найважливішою біологічною функцією поліненасичених жирних кислот є їх участь у синтезі тканинних гормонів простагландинів, які відіграють важливу функцію у сперматогенезі.

30 7. Лецитин - природний фосфоліпід, важливий антиоксидант, бере участь в утворенні та регенерації клітинних мембран, нормалізує ліпідний обмін за рахунок відновлення оптимального співвідношення ліпопротеїдів високої та низької щільності плазми крові, проводить дисперсію надлишку загального холестеролу та його виведення, підвищує енергетичний потенціал клітин та засвоєння тіаміну і вітаміну А.

8. Твін-20 - поверхнево активна речовина, яка підвищує процеси емульгування жирів.

35 Препарат для стимуляції статеві активності та сперматогенезу у баранів вводять одноразово на добу до концентрованих кормів у дозі 2 мл впродовж 45 діб з розрахунку його дії на активацію сперматогенезу, статеві активності, кількості та якості сперми.

Корисна модель пояснюється прикладом.

40 Дослідження проводились у ФОН "Когут Б.М." Городецького району Львівської області. Було відібрано 12 клінічно здорових баранів, віком 2-4 роки породи тексель, які утримували у чотирьох клітках по три голови у кожній.

Дослідження проводили у період статевого спокою (березень-травень). Тварин поділили на дві групи-аналоги: контрольну і дослідну по 6 голів у кожній. Барани контрольної групи отримували основний раціон, до складу якого входили: сіно - 2 кг, силос кукурудзяний - 1 кг, комбікорм - 500 г, у якому три частини вівса, одна частина пшениці та одна частина кукурудзи.

45 Баранам дослідної групи індивідуально до комбікорму додавали впродовж 45 діб ліпосомальну вітамінно-мінеральну добавку у дозі 2 мл на голову на добу.

Через 45 діб від початку експерименту, тобто після закінчення згодовування добавки тваринам дослідної групи, впродовж трьох тижнів, від баранів отримували еякуляти на штучну вагіну з режимом використання плідників дуплетна садка два рази на тиждень. Визначали фізіологічні показники якості еякулятів: об'єм, концентрацію спермій, кількість життєздатних і дегенерованих спермій, а також їх активність та виживання.

50 Дослідженнями встановлено позитивний вплив згодовування баранам ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки на кількісні та якісні показники сперми. Зокрема, об'єм еякуляту у баранів дослідної групи став на 17,6 % більшим ($P < 0,05$), ніж у контрольних самців (табл.).

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ Б

UA 153959 U

Таблиця

Якість еякулятів баранів за згодовування
ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки ($M \pm m$, $m=6$)

Показник	Група тварин	
	контрольна	дослідна
Об'єм еякуляту, мл	1,08±0,06	1,27±0,06*
Концентрація спермій, $\times 10^6$ клітин/мл	3,04±0,06	3,29±0,06**
Загальна кількість спермій, $\times 10^9$ клітин	3,28±0,22	4,12±0,23*
Життєздатних спермій (рухливість), %	85,2±1,82	91,4±1,34*
Активність спермій (з ППР), %	78,3±2,79	86,7±1,67*
Спермій з цитоплазматичними краплями, %	6,2±0,30	3,9±0,46***
Дегенерованих спермій, %	8,6±0,99	4,7±0,55*
Виживання спермій за 4 °C, год.	94,0±2,27	103,5±1,98*

Примітка: * - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$, *** - $P < 0,001$ порівняно контрольною групою.

Аналогічно, концентрація спермій та загальна кількість спермій в еякуляті баранів дослідної групи відповідно на 8,2 % ($P < 0,01$) і 27,4 % ($P < 0,05$) вищі, порівняно з тваринами контрольної групи. Згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки збільшило на 7,3 % ($P < 0,05$) відсоток життєздатних спермій (з прямолинійно поступальним рухом) у період статевих спокій. Водночас, частка спермій з цитоплазматичними краплями та дегенерованих статевих клітин значно зменшилися - відповідно, на 37,1 % ($P < 0,001$) та 45,3 % ($P < 0,05$).

Дослідженням фізіологічних параметрів нативної сперми баранів-плідників встановлено, що активність спермій баранів після згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки була на 12,4 % вищою ($P < 0,05$) порівняно з контрольними тваринами (табл.). Значення активності спермій баранів дослідної групи (88,2±2,41 %) наближається до максимуму і вказує на високу якість еякулятів за впливу вітамінів А, D₃, Е, С та глюконату цинку.

Отже, згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки баранам у період статевих спокій підвищує активність та виживання деконсервованих спермій на фоні значного зменшення дегенерованих спермій, що дозволяє отримати додаткову кількість спермодоз високої якості.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб стимуляції статевої активності та сперматогенезу у баранів, що включає згодовування баранам-плідникам впродовж 45 днів з комбікормом ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки у дозі 2 мл на голову на добу, у наступному співвідношенні компонентів на 20 мл препарату:

вітамін А	250000-500000 МО
вітамін D ₃	25000-50000 МО
вітамін Е	250-500 мг
вітамін С	500-800 мг
глюконат цинку	200-350 мг
олія соняшникова рафінована	2,0-2,5 мл
лецитин	0,2-0,3 г
твін-20	0,01-0,015 мл
дистильована вода до	20,0 мл.

Комп'ютерна верстка Л.Бурлак

ДО "Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ Б

(11) **153959**(19) **UA**

(51) МПК (2023.01)

A61D 19/00**A61K 45/00**(21) Номер заявки: **u 2022 03363**(22) Дата подання заявки: **13.09.2022**(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **28.09.2023**(46) Дата публікації відомостей про державну реєстрацію та номер Бюлетеня: **27.09.2023, Бюл. № 39**

(72) Винахідники:

**Гевкан Іван Іванович, UA,
Яремчук Ірина Митодіївна,
UA,
Шаран Ольга Миколаївна,
UA,
Стефаник Василь Юрійович,
UA**

(73) Володілець:

**ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ,
вул. В. Стуса, 38, м. Львів-34,
79034, UA**

(54) Назва корисної моделі:

СПОСІБ ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ СТАТЕВОЇ АКТИВНОСТІ ТА СПЕРМАТОГЕНЕЗУ У БАРАНІВ

(57) Формула корисної моделі:

Спосіб стимуляції статевої активності та сперматогенезу у баранів, що включає згодовування баранам-плідникам впродовж 45 днів з комбікормом ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки у дозі 2 мл на голову на добу, у наступному співвідношенні компонентів на 20 мл препарату:

вітамін А	250000-500000 МО
вітамін D ₃	25000-50000 МО
вітамін Е	250-500 мг
вітамін С	500-800 мг
глюконат цинку	200-350 мг
олія соняшникова рафінована	2,0-2,5 мл
лецитин	0,2-0,3 г
твін-20	0,01-0,015 мл
дистильована вода до	20,0 мл.

ДОДАТОК В
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ
Шаран Ольги Миколаївни

1. **Шаран ОМ.**, Стефаник ВЮ. Гематологічні показники та якість сперми баранів під час статевого спокою за згодовування ліпосомальної добавки. *Біологія тварин*, 2022; 24 (4): 12–16. <https://doi.org/10.15407/animbiol24.04.012> (Здобувачка брала участь у проведенні дослідів, обробці експериментальних даних та описі результатів дослідження).
2. **Шаран ОМ.** (2023). Якість сперми баранів за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки у період статевого спокою. *НВ ЛНУ ветеринарної медицини та біотехнологій. Серія: Ветеринарні науки*, 25(111), 84-89. <https://doi.org/10.32718/nvlvet11113>.
3. **Sharan O.**, Stefanyk V., Murawski M. T. The quality of ram spermatozoa after thawing with the addition of Mn^{2+} , Zn^{2+} and Cu^{2+} nanocitrate to cryopreservation diluent. *The Animal Biology*, 2023; 25 (2): 8–13. <https://doi.org/10.15407/animbiol25.02.008> (Здобувачка брала участь у проведенні дослідів, обробці експериментальних даних та описі результатів дослідження).
4. **Sharan, O.**, Stefanyk, V., & Ostapiv, D. (2023). Якість та запліднювальна здатність сперміїв після додавання наносукцинатів Mn, Cu, Zn до розріджувача сперми барана. *НВ ЛНУ ветеринарної медицини та біотехнологій. Серія: Ветеринарні науки*, 25(110), 142-148. <https://doi.org/10.32718/nvlvet11024> (Здобувачка брала участь у проведенні дослідів та інтерпретації отриманих результатів дослідження).
5. **Шаран ОМ.** Кінематичні показники та дихальна активність деконсервованих сперміїв баранів за додавання наноцитрату Mn, Zn та Cu до середовища для кріоконсервування. *Біологія тварин*, 2023; 25 (3): 23–30. <http://doi.org/10.15407/animbiol25.03.023>
6. Гевкан ІІ, Яремчук ІМ, **Шаран ОМ**, Стефаник ВЮ. Спосіб для стимуляції статевої активності та сперматогенезу у баранів. Патент України на корисну модель № 153959. 2023 Вер. 29 (Здобувачка була співавтором ідеї корисної моделі і виконала експериментальні дослідження).

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ В

Тези конференцій

1. **Sharan O**, Stefanyk V, Ostapiv D. Quality of ram spermatozoa in diluent with addition of Cu^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} nanocitrate as microelement after thawing. *The 1st Ukrainian-Polish Scientific Forum AGROBIOPERSPECTIVES 29–30 September 2021, Lviv, Ukraine*. The Animal Biology, 2021; 23 (3): 106.
2. **Шаран О.М.**, Стефаник В.Ю., Остапів Д.Д. Якість сперміїв баранів за додавання наносукцинатів Cu^{2+} , Zn^{2+} і Mn^{2+} до розріджувачів після деконсервування. *Матеріали II Конференції «Сучасні методи діагностики, лікування та профілактика у ветеринарній медицині»*, 18-19 листопада 2021, м. Львів. (Здобувач брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів, підготовці тез до друку та усній доповіді на конференції).
3. **Шаран ОМ.**, Стефаник ВЮ. Якість сперміїв баранів за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки в період статевого спокою. *XX Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених 19 травня 2022 року, м. Львів, Україна*. Біологія тварин, 2022; 24 (2): 74.
4. **Шаран ОМ.** Якісні параметри сперми баранів у період статевого спокою за згодовування ліпосомальної вітамінно-мінеральної добавки. *XXI Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених 18–19 травня 2023 року, м. Львів, Україна*. Біологія тварин, 2023; 25 (2): 79.

Публікації, які додатково відображають наукові результати дисертації

Stetsyshyn Y, Raczkowska J, Harhay K, Awsiuk K, Shymborska Y, Nastyshyn S, Ohar H, Vasilyev V, Ostapiv D, Sharan M, **Sharan O**, Voronov S. Grafted polymer brush coatings for growth of cow granulosa cells and oocyte-cumulus cell complexes /Y. Stetsyshyn, // Biointerphases, American Vacuum Society. 2020/
<https://doi.org/10.1116/6.0000183>