



## Кінематичні показники та дихальна активність деконсервованих спермій баранів за додавання наноцитрату Mn, Zn та Cu до середовища для кріоконсервування

О. М. Шаран  
oshaom737@gmail.com



Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Ґжицького, вул. Пекарська, 50, м. Львів, 79010, Україна

### ORCID:

O.M. Sharan <https://orcid.org/0000-0002-6193-8727>

### Authors' Contributions:

**SOM:** conceptualization, investigation, methodology, statistics, formal analysis, visualization, writing — original draft, review and editing.

### Declaration of Conflict of Interests:

None to declare.

### Ethical approval:

During the scientific and experimental study, all international, national and/or institutional principles of animal care and use, in particular "Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes" were followed.

### Acknowledgements:

None.



Attribution 4.0 International  
(CC BY 4.0)

Метою роботи було з'ясувати вплив додавання наноцитрату Mn, Zn та Cu до середовища для кріоконсервування сперми баранів на кінематичні показники та дихальну активність деконсервованих спермій. Експеримент проводили на шести клінічно здорових баранах-плідниках породи тексель віком 2–4 роки. Після отримання еякуляти баранів оцінювали за об'ємом, концентрацією та рухливістю спермій і ділили на контрольну і дослідні групи. Контрольні зразки сперми розбавляли лактозо-жовтково-тріс-цитратогліцериним середовищем (ЛЖТЦГС). У дослідних зразках сперми баранів до середовища додавали наноцитрати мікроелементів у дозах: Zn і Mn — 2,5, 5,0 та 7,5 мкг/л, Cu — 1,25, 2,5, і 3,75 мкг/л. Розріджену сперму фасували в солонинки, еквілібрували впродовж 2,5 год і заморожували. Після розморожування сперми визначали рухливість, морфологічні ушкодження спермій, кінематичні параметри руху спермій (CASA), дихальну та відновну активність сперми. Встановлено дозозалежну дію наноцитратів Mn, Zn та Cu за додавання їх до ЛЖТЦГС. За додавання наноцитрату Mn і Zn у дозі 5,0 мкг/л до ЛЖТЦГС вірогідно ( $P < 0,05-0,01$ ) підвищується активність деконсервованих спермій баранів, а додавання наноцитрату Cu у зростаючих дозах значно знижує активність спермій у розмороженій спермі баранів. Додавання наноцитрату Mn і Zn в оптимальній дозі 5,0 мкг/л до ЛЖТЦГС вірогідно ( $P < 0,05-0,01$ ) зменшує кількість дегенерованих спермій та з ушкодженими акросомами, а за додавання наноцитрату Cu у зростаючих дозах значно збільшуються морфологічні порушення статевих клітин. Додавання наноцитрату Mn і Zn у дозі 5,0 мкг/л до ЛЖТЦГС вірогідно ( $P < 0,01-0,001$ ) підвищує кінематичні параметри деконсервованих спермій баранів, а додавання наноцитрату Cu у зростаючих дозах значно знижує показники руху статевих клітин. За додавання наноцитратів Mn і Zn до середовища для кріоконсервування сперми баранів підвищується дихальна та інгібується відновна активність деконсервованої сперми. Додавання наноцитрату Cu до ЛЖТЦГС у зростаючих дозах знижує дихальну та підвищує відновну активність розмороженої сперми баранів.

**Ключові слова:** баран, сперма, наноцитрат Mn, Zn, Cu, кінематичні показники, рухливість, дихальна активність

## Вступ

Штучне осіменіння є одним із сучасних методів репродуктивної біотехнології, здатним суттєво підвищити генетичну цінність та адаптаційні властивості овець за постійної наявності кріоконсервованої сперми плідників [23]. У зв'язку з цим, в останні роки кріоконсервацію сперми баранів розглядають як один із методів підвищення продуктивності овець [1].

Експериментально встановлено, що технологічний процес кріоконсервування сперми провокує ультраструктурні, біохімічні та функціональні зміни сперматозоїдів [32]. Водночас плазма і акросома спермія мають високу криочутливість, що призводить до збільшення проникності клітинних мембран і виникнення порушень рухливості статевих клітин та їхньої морфології [33, 8]. Ушкодження плазматичних мембран супроводжується витоком ферментів, зокрема тих, які беруть безпосередню участь у процесах запліднення. Крім того, руйнуються мітохондрії — основні енергогенеруючі органели статевих клітин [30].

З метою забезпечення надійного захисту спермій від несприятливих чинників за дії наднизьких температур використовують різні синтетичні середовища для кріоконсервування, склад яких визначає ефективність заморожування [41].

Мікроелементи Zn, Mn та Cu відіграють важливу роль у регулюванні метаболічних процесів у сперміях, оскільки є кофакторами ферментів гліколізу, дихального ланцюга мітохондрій та антиоксидантного захисту, а також забезпечують енергетичні потреби й утилізацію цитотоксичних метаболітів клітин [27]. Зокрема, Цинк входить до активних центрів багатьох ферментів гліколізу й пентозофосфатного шляху окиснення глюкози, Купрум забезпечує активність ферментів дихального ланцюга і протеїназ, а Манган — ферментів циклу Кребса. Крім того, вказані мікроелементи входять до складу першої ланки ферментативного антиоксидантного захисту — супероксиддисмутази (СОД), тобто є кофакторами ферменту, що перетворює  $O_2^-$  і гальмує утворення активних форм Оксигену (АФО) [5, 19]. Встановлено, що СОД у сперміях наявна у трьох генетично зумовлених ізоформах, які містять у каталітичному центрі йони: Mn — мітохондріальній; Zn і Cu — цитоплазматичній і екзоцелюлярній [37, 20]. У цих дослідженнях доведено, що від активності вказаного ферменту та співвідношення його ізоформ, вмісту Купруму залежить виживання і, відповідно, запліднювальна здатність статевих клітин.

У процесі підготовки еякулятів до кріоконсервування зменшується концентрація вказаних йонів, що призводить до зниження активності ферментів та, як наслідок, порушує процес трансформації субстратів і ресинтез АТФ. Тому для збереження високих фізіологічних характеристик і запліднювальної здатності спермій до складу розріджувачів еякулятів додають мікроелементи. Проте використання неорганічних солей мікроелементів у складі розріджувачів мало-

ефективне, що зумовлено нетривалим їх контактом зі статевими клітинами після розрідження сперми, низькою проникливістю через мембрани та здатністю залучатись у метаболізм [31].

Недоліки використання неорганічних солей мікроелементів у розріджувачах еякулятів можна усунути застосуванням органічних форм металів, зокрема наноцитратів, що дозволить забезпечити їх залучення в обмінні процеси спермій [17, 22].

Нещодавно в Україні за допомогою нанотехнології дослідниками отримано надчисті карбоксилати основних харчових кислот і біотичних елементів (Zn, Mg, S, Mn, Fe, Cu, Co, Mo, Cr, I, Se), що стало основою для розроблення нового напрямку збагачення кормових добавок мікроелементами у вигляді цитратів біотичних елементів, одержаних за допомогою аквананотехнології [14, 35]. В Інституті біології тварин НААН 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 [44, 13]. Також проведено експерименти з вивчення впливу додавання наносукцинату Zn, Mn та Cu до розріджувачів сперми бугаїв, що допомогло з'ясувати позитивну дію наносукцинату мангану та цинку на якісні параметри спермій [16, 49]. У зв'язку з наведеним вище, доцільно дослідити вплив наносукцинату та наноцитрату Mn, Zn та Cu у складі розріджувачів сперми на якісні показники спермій баранів. Тому метою дослідження було з'ясувати вплив додавання наноцитрату Mn, Zn та Cu до середовища для кріоконсервування сперми на кінетичні показники та дихальну активність деконсервованих спермій баранів.

## Матеріали і методи

Дослідження проведено на шести клінічно здорових баранах породи тексель віком 2–4 роки, які утримували у трьох клітках по два самці у кожній. Сперму від баранів отримували за допомогою штучної вагіни *Minitube* і кожний еякулят оцінювали окремо. Свіжотримані еякуляти оцінювали за об'ємом, концентрацією спермій, загальною кількістю спермій у еякуляті, їхньою рухливістю, відсотком спермій з прямолінійно-поступальним рухом за загальноприйнятими методиками. Кожен еякулят ділили на контрольну і дослідні групи. Для розбавлення використовували сперму баранів з рухливістю не нижче 8 балів і концентрацією не менше 2,5 млрд/мл. Після оцінювання сперму витримували за кімнатної температури 15 хв, потім контрольні зразки одномоментно розбавляли лактозо-жовтково-тріс-цитрато-гліцериним середовищем (ЛЖТЦГС) у співвідношенні 1:2–1:3, вливаючи середовище у сперму з розрахунком одержати у дозі деконсервованої сперми не менше 60–80 млн. спермій з прямолінійно-поступальним рухом.

ЛЖТЦГС готували у два етапи. Спочатку 13 г лактози розчиняли в 100 мл дистильованої води за температури 90°C, а після охолодження до 40°C до розчину додавали 30 мл яєчного жовтка. Далі суміш ретельно перемішували за допомогою магнітної мішалки до отримання однорідної суспензії. Потім у 100 мл цієї суспензії по чергово розчиняли трис (0,6 г), лимонну кислоту (0,3 г) і насамкінець додавали 9 мл гліцерину.

У дослідних зразках сперми баранів до ЛЖТЦГС додавали наночитрати мікроелементів у дозах: Zn і Mn — 2,5, 5,0 та 7,5 мкг/л, Cu — 1,25, 2,5 і 3,75 мкг/л. Наночитрати Mn, Zn та Cu отримані методом ерозійно-вибухової аквананотехнології від ТОВ «Нанотехнології та наноматеріали» (м. Київ) [18].

Розбавлену сперму за допомогою спеціального обладнання (*Minitube*, Німеччина) фасували у соломинки і охолоджували протягом 2,5 год за температури +2...+4°C. Після цього соломинки зі спермою поміщали в пари азоту на 30 хв, потім опускали в рідкий азот. Після заморожування у кожній серії сперми контролювали рухливість спермійів. Для цього розморожували 1–2 соломинки на водяній бані за температури 40–42°C впродовж 20 сек. Сперму вважали придатною для зберігання і використання за наявності у ній не менше 40% спермійів з прямолінійно-поступальним рухом.

Після розморожування визначали рухливість, морфологічні порушення, дихальну та відновну активність спермійів. Життєздатність статевих клітин, морфологічні порушення та відсоток дегенеративних спермійів визначали комп'ютеризованою системою CASA (*Computer Assisted Semen Analysis*) з активуванням модуля *Sperm Vision* [48].

Інтенсивність поглинання кисню спермою (нгатом  $O \div 0,1$  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) [45].

Для всіх зразків обчислювали середнє арифметичне значення і середньоквадратичну помилку ( $M \pm m$ ). Отриманий цифровий матеріал статистично опрацьовували із застосуванням пакету програм *Microsoft Office Excel 2010*.

## Результати

Експериментально встановлено, що дія наночитратів мікроелементів у складі середовища для кріоконсервування сперми на якісні показники деконсервованої сперми баранів значно залежала від дози елемента. Додавання наночитрату Mn у дозі 2,5 мкг/л підвищило активність деконсервованих спермійів баранів лише на 5,6% порівняно з контролем (табл. 1). Водночас за додавання наночитрату Mn у дозі 5,0 мкг/л активність спермійів підвищилася на 22,2% ( $P < 0,05$ ) порівняно з контролем. Подальше збільшення дози нано-

**Таблиця 1.** Активність та морфологічні порушення спермійів баранів за додавання наночитрату мікроелементів ( $n=6$ ,  $M \pm m$ )  
**Table 1.** Activity and morphological disorders of rams' sperm after the addition of trace elements nanocitrate ( $n=6$ ,  $M \pm m$ )

Наночитрат мікроелемента, доза, мкг/л Micronutrient nanocitrate, dose, $\mu\text{g/l}$	Активність спермійів, % Sperm motility, %	Дегенеровані спермійів, % Degenerate sperm, %	Спермійів з ушкодженою акросомою, % Sperm with damaged acrosome, %	
Mn <sup>2+</sup>	2,5	47,5 $\pm$ 1,12	12,0 $\pm$ 1,41	20,5 $\pm$ 1,54
	5,0	55,0 $\pm$ 1,83*	10,3 $\pm$ 0,88*	16,5 $\pm$ 1,26*
	7,5	44,2 $\pm$ 1,54	14,2 $\pm$ 1,35	21,0 $\pm$ 1,24
Zn <sup>2+</sup>	2,5	50,8 $\pm$ 1,54*	12,5 $\pm$ 1,12	19,5 $\pm$ 0,99*
	5,0	56,7 $\pm$ 1,67***	9,5 $\pm$ 0,67**	15,5 $\pm$ 1,26*
	7,5	46,7 $\pm$ 2,11	12,8 $\pm$ 0,79	20,7 $\pm$ 1,28
Cu <sup>2+</sup>	1,25	47,3 $\pm$ 2,67	14,5 $\pm$ 1,12	20,3 $\pm$ 1,67*
	2,5	39,2 $\pm$ 3,01	19,0 $\pm$ 1,24*	27,5 $\pm$ 1,26
	3,75	35,0 $\pm$ 1,83*	18,2 $\pm$ 0,65*	28,5 $\pm$ 2,24**
Контроль Control		45,0 $\pm$ 1,83	15,0 $\pm$ 1,07	23,3 $\pm$ 1,54

*Примітка.* У цій і наступних таблицях \* —  $P < 0,05$ , \*\* —  $P < 0,01$ , \*\*\* —  $P < 0,001$  порівняно з контрольною групою.

*Note.* In this and the following tables \* —  $P < 0.05$ , \*\* —  $P < 0.01$ , \*\*\* —  $P < 0.001$  compared with the control group.

цитрату мангану до 7,5 мкг/л призвело до зниження активності спермійів баранів до рівня контролю.

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

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

Більш виражені зміни активності та морфологічних порушень розморожених спермійів баранів встановлено і за додавання наночитрату цинку до ЛЖТЦГС (табл. 1). Зокрема, активність спермійів за додавання 2,5, 5,0 і 7,5 мкг/л наночитрату Zn зросла, відповідно, на 12,9% ( $P < 0,05$ ), 26,0% ( $P < 0,01$ ) та 3,8% порівняно з контролем. Водночас відсоток спермійів дегенеративних та з ушкодженням акросоми у деконсервованій спермі баранів суттєво знижувалися за додавання наночитрату цинку до середовища для кріоконсервування. За додавання 2,5, 5,0 і 7,5 мкг/л наночитрату Zn відсоток

дегенерованих спермійв зменшився, відповідно, на 16,7%, 36,7% ( $P < 0,01$ ) та 14,7% порівняно з контролем. Аналогічно, додавання наноцитрату цинку до ЛЖТЦГС у дозах 2,5, 5,0 і 7,5 мкг/л знизив відсоток спермійв баранів з ушкодженою акросомою на 16,3% ( $P < 0,05$ ), 33,5% ( $P < 0,05$ ) та 11,2% відповідно порівняно з контролем.

Додавання наноцитрату купруму до середовища для кріоконсервування сперми баранів спричинило дещо інші зміни активності та морфологічних порушень спермійв (табл. 1). Зокрема, зі збільшенням дози наноцитрату Cu активність спермійв у деконсервованій спермі баранів знижувалася. Додавання 1,25 мкг/л наноцитрату купруму призвело до підвищення активності спермійв у розмороженій спермі на 5,1%. Подальше підвищення дози наноцитрату Cu до 2,5 та 3,75 мкг/л спричинило зниження активності спермійв баранів, відповідно, на 12,9 та 35,0% ( $P < 0,05$ ) порівняно з контролем. Водночас зі збільшенням дози наноцитрату купруму збільшується кількість морфологічних порушень статевих клітин — додавання 2,5 і 3,75 мкг/л наноцитрату Cu збільшило відсоток дегенерованих спермійв 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 спермійв — на 3,4% порівняно з контролем. Аналогічно, відсоток спермійв 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 на 18,0 і 22,3% ( $P < 0,01$ ) відповідно порівняно з контролем.

**Таблиця 2.** Кінематичні показники деконсервованих спермійв (CASA) баранів за додавання наноцитрату мангану, мкм/с ( $n=6$ ,  $M \pm m$ )  
**Table 2.** Kinematic parameters of thawed spermatozoa (CASA) of rams after the addition of manganese nanocitrate,  $\mu\text{m/s}$  ( $n=6$ ,  $M \pm m$ )

Показник Parameter	Доза наноцитрату мангану, мкг/л Dose of manganese nanocitrate, $\mu\text{g/l}$			Контроль Control
	2,5	5,0	7,5	
VCL	149,8 $\pm$ 4,54**	157,8 $\pm$ 4,41**	145,2 $\pm$ 2,37	138,5 $\pm$ 4,27
VAP	74,2 $\pm$ 2,12**	80,5 $\pm$ 2,01**	64,2 $\pm$ 2,39	64,5 $\pm$ 2,81
VSL	62,5 $\pm$ 1,57**	71,2 $\pm$ 2,89***	58,3 $\pm$ 2,95	54,2 $\pm$ 2,04
LIN, %	41,9 $\pm$ 1,39	51,1 $\pm$ 1,25***	44,6 $\pm$ 2,72	39,2 $\pm$ 1,58
STR, %	84,4 $\pm$ 2,12	88,5 $\pm$ 3,45	91,0 $\pm$ 3,68*	84,4 $\pm$ 3,11
WOB, %	49,7 $\pm$ 2,03	51,1 $\pm$ 1,25*	44,6 $\pm$ 2,72	46,8 $\pm$ 2,37

**Таблиця 4.** Кінематичні показники деконсервованих спермійв (CASA) баранів за додавання наноцитрату купруму, мкм/с ( $n=6$ ,  $M \pm m$ )  
**Table 4.** Kinematic parameters of thawed spermatozoa (CASA) of rams after the addition of cuprum nanocitrate,  $\mu\text{m/s}$  ( $n=6$ ,  $M \pm m$ )

Показник Parameter	Доза наноцитрату купруму, мкг/л Dose of cuprum nanocitrate, $\mu\text{g/l}$			Контроль Control
	1,25	2,5	3,75	
VCL	142,2 $\pm$ 4,26	135,5 $\pm$ 5,95	124,2 $\pm$ 4,37**	138,5 $\pm$ 4,27
VAP	69,2 $\pm$ 2,12*	60,2 $\pm$ 2,15	51,3 $\pm$ 1,71**	64,5 $\pm$ 2,81
VSL	54,0 $\pm$ 2,27	46,3 $\pm$ 3,58**	40,2 $\pm$ 3,15**	54,2 $\pm$ 2,04
LIN, %	38,1 $\pm$ 1,63	34,3 $\pm$ 2,65*	32,5 $\pm$ 2,45*	39,2 $\pm$ 1,58
STR, %	78,2 $\pm$ 3,11	77,1 $\pm$ 5,88	78,2 $\pm$ 5,24	84,4 $\pm$ 3,11
WOB, %	52,5 $\pm$ 1,02	52,9 $\pm$ 2,26	47,9 $\pm$ 2,64	46,8 $\pm$ 2,37

Дослідженням рухливості спермійв комп'ютеризованою системою CASA встановлено зміни кінематичних показників спермійв 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. 2).

Збільшення дози наноцитрату Mn до 5,0 мкг/л забезпечило найбільше зростання кінематичних показників деконсервованих спермійв: 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 ЛЖТЦГС наноцитрату Mn у найвищій дозі 7,5 мкг/л зростання кінематичних показників розморожених спермійв баранів було незначним: VCL — на 4,8%, VAP — на 0,5% і VSL — на 7,6% порівняно з контролем.

Вищі значення динамічних показників спермійв баранів за дії наноцитрату Mn призвели до підвищення коефіцієнтів їхнього 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.

**Таблиця 3.** Кінематичні показники деконсервованих спермійв (CASA) баранів за додавання наноцитрату цинку, мкм/с ( $n=6$ ,  $M \pm m$ )  
**Table 3.** Kinematic parameters of thawed spermatozoa (CASA) of rams after the addition of zinc nanocitrate,  $\mu\text{m/s}$  ( $n=6$ ,  $M \pm m$ )

Показник Parameter	Доза наноцитрату цинку, мкг/л Dose of zinc nanocitrate, $\mu\text{g/l}$			Контроль Control
	2,5	5,0	7,5	
VCL	150,2 $\pm$ 4,67	162,5 $\pm$ 5,95**	145,5 $\pm$ 4,40	138,5 $\pm$ 4,27
VAP	74,3 $\pm$ 2,12**	80,2 $\pm$ 1,92**	65,7 $\pm$ 1,82	64,5 $\pm$ 2,81
VSL	64,7 $\pm$ 2,11***	71,7 $\pm$ 3,58***	58,5 $\pm$ 2,55	54,2 $\pm$ 2,04
LIN, %	43,1 $\pm$ 1,27	44,5 $\pm$ 2,84	40,3 $\pm$ 1,86	39,2 $\pm$ 1,58
STR, %	87,2 $\pm$ 3,08	89,2 $\pm$ 3,81	89,1 $\pm$ 2,79	84,4 $\pm$ 3,11
WOB, %	49,6 $\pm$ 1,21	49,6 $\pm$ 1,73	45,4 $\pm$ 2,04	46,8 $\pm$ 2,37

*Примітка.* У табл. 2–4 VCL — швидкість спермія при криволінійному русі, VAP — швидкість просування головки спермія по середній траєкторії руху, VSL — швидкість прямолінійного руху головки спермія уздовж прямого відрізка між початковою і кінцевою точками траєкторії, LIN — ступінь лінійності спермійв, STR — ступінь прямолінійності руху спермійв, WOB — ступінь відхилення руху спермійв.  
*Note.* In tables 2–4 VCL means sperm velocity during curvilinear movement, VAP — sperm head advancement velocity along the average trajectory, VSL — rectilinear movement velocity of the sperm head along the straight line between the trajectory initial and final points, LIN — sperm linearity level, STR — sperm movement rectilinearity level, WOB — sperm movement deviation level.

Ступінь прямолінійності руху сперміїв 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 за додавання наноцитрату Zn до середовища для кріоконсервування сперми баранів. Зокрема, додавання 2,5 мкг/л наноцитрату цинку спричинило зростання кінематичних показників розморожених сперміїв: VCL — на 8,3%, VAP — на 13,8% ( $P < 0,01$ ) та VSL — на 19,4% ( $P < 0,001$ ) порівняно з контролем (табл. 3).

Найбільшу різницю кінематичних показників сперміїв 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 кінематичних показників сперміїв у деконсервованій спермі баранів. Значення криволінійної швидкості (VCL), середньої швидкості (VAP) та прямолінійної швидкості (VSL) руху сперміїв баранів були вищими від контролю, відповідно, на 5,1%, 1,9 та 7,9%.

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

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

Додавання наноцитрату Cu до ЛЖТЦГС призвело до інших змін динамічних показників сперміїв баранів після розморожування. За додавання 2,5 мкг/л наноцитрату купруму кінематичні показники сперміїв були на рівні контролю або дещо його перевищували: VCL і VAP були вищими, відповідно, на 2,7 і 10,3% ( $P < 0,05$ ), а VSL майже не відрізнявся від контрольного значення (табл. 4).

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

Зменшення значень кінематичних параметрів деконсервованих сперміїв під впливом наноцитрату Cu спричинило зниження коефіцієнтів рухливості. Ступінь лінійності (LIN) сперміїв баранів за додавання

**Таблиця 5.** Дихальна і відновна активність розмороженої сперми баранів за додавання наноцитратів мікроелементів ( $n=6$ ,  $M \pm m$ )  
**Table 5.** Oxidation and reduction activity of thawed ram sperm after the addition of nanocitrates of trace elements ( $n=6$ ,  $M \pm m$ )

Наноцитрат мікроелемента, доза, мкг/л Micronutrient nanocitrate, dose, $\mu\text{g/l}$	Дихальна активність, нг-атом $\text{O}_2/0,1 \text{ мл} \times \text{хв}$ Oxidation processes, ng-atom $\text{O}_2/0,1 \text{ ml} \times \text{min}$	Відновна активність, мВ/0,1 мл×хв Reduction processes, mV/0.1 ml×min	
Mn <sup>2+</sup>	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 <sup>2+</sup>	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 <sup>2+</sup>	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 Control		2,20±0,15	0,20±0,013

наноцитрату купруму в дозах 1,25, 2,5 та 3,75 мкг/л був нижчим від контролю на 2,8%, 12,5% ( $P < 0,05$ ) та 17,1% ( $P < 0,05$ ) відповідно.

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

У дослідженні інтенсивності споживання кисню сперміями встановлено зміни дихальної та відновної активності деконсервованої сперми баранів за додавання наноцитрату Mn, Zn і Cu до ЛЖТЦГС. Додавання наноцитрату 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. 5). Водночас за додавання 5 мкг/л наноцитрату Mn дихальна активність сперми баранів була максимально вищою від контролю — на 18,2% ( $P < 0,05$ ).

Протилежну закономірність спостерігали за відновною активністю деконсервованої сперми баранів під впливом наноцитрату мангану. Зокрема, за додавання наноцитрату Mn спостерігали зниження відновної активності сперми порівняно з контролем: у дозі 2,5 мкг/л — на 10,0%, 5,0 мкг/л — 20,0% ( $P < 0,05$ ), а в 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. 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 з контролем. 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 ЛЖТЦГС спричинило дещо інші зміни споживання кисню у деконсервованій спермі баранів — 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 в 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.

## Обговорення

Використання заморожено-відталого сперми баранів має важливе значення в сучасних методах розмноження овець, тому кріоконсервування є важливим інструментом для репродуктивних технологій [2]. Відомо, що розріджувачі, методи розведення-охолодження-заморожування та розморожування відіграють важливу роль в успіху кріоконсервації сперми баранів [40]. Для підтримання високих фізіологічних характеристик спермій до складу розріджувачів еякулятів додають мікроелементи. Водночас літературні дані вказують на негативний вплив надлишку мікроелементів на фізіологічні характеристики і запліднювальну здатність спермій [34, 46]. За надмірної кількості окремих елементів можливе порушення функцій мітохондрій, що призводить до зниження фізіологічних характеристик і запліднювальної здатності спермій [24].

З огляду на вказане вище, багато авторів проводять дослідження з впливу на якість спермій ссавців металів у вигляді нанорозмірних форм або наночастинок [6, 15, 12]. Нещодавно в Україні розроблено нову технологію одержання нанокарбоксилатів макро- і мікроелементів, зокрема наносукцинату та наноцитрату мангану, цинку та купруму [3, 11, 18]. У дослідженнях з використанням сперми бугаїв встановлено ефективність середовища для кріоконсервування сперми бугаїв-плідників з додаванням до складу наносукцинату Mn, Zn і Cu, а також визначено їх оптимальні дози, здатні позитивно впливати на рухливість, виживання та запліднювальну здатність спермій [49, 16].

Зважаючи на вищезазначене, ми провели експеримент з вивчення впливу додавання наноцитрату Mn, Zn і Cu до складу середовища для кріоконсервування сперми баранів на кінематичні показники та дихальну активність деконсервованих спермій. Експериментально з'ясовано, що додавання наноцитрату Mn і Zn в оптимальній дозі 5,0 мкг/л до ЛЖТЦГС вірогідно підвищує активність розморожених спермій баранів, а також знижує відсоток спермій з морфологічними порушеннями. Натомість додавання наноцитрату Cu у зростаючих дозах значно знижує активність спермій

у розмороженій спермі баранів, одночасно підвищуючи відсоток дегенеративних спермій та ушкодження акросом. Це підтверджує дослідження T. Leahy et al., у яких встановлено, що надлишок  $Cu^{2+}$  в розрідженій спермі барана спричиняє аглютинацію спермій внаслідок окиснення вільних сульфгідрильних груп до дисульфідних [21].

Рухливість спермій є важливим компонентом репродуктивної здатності самців, оскільки вона є важливою для міграції в статевому тракті та взаємодії гамет для запліднення [28]. Саме здатність чоловічих клітин активно рухатись дозволяє їм подолати анатомо-фізіологічні бар'єри жіночих статевих органів і запліднити яйцеклітину [39]. Оцінка рухливості спермій традиційним мікроскопічним методом є досить суб'єктивною [36] і не завжди корелює зі здатністю до запліднення [29]. Розроблений наприкінці XX ст. комп'ютерний аналіз спермій (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 спермій за допомогою двовимірного відстеження руху головки сперми, що робить її популярним методом перевірки якості сперми в лабораторіях племінних центрів [42].

Дослідження взаємозв'язку між параметрами руху спермій, отриманими за допомогою системи CASA, і репродуктивною здатністю проводили у багатьох видів, зокрема баранів [47]. Кореляція між аналізом рухливості CASA та запліднювальною здатністю спермій на баранах досліджена менше, порівняно з іншими видами тварин, і має різні результати. O'Meara et al. повідомили [25] про відсутність зв'язку між аналізом CASA спермій барана та репродуктивною здатністю статевих клітин. Проте більшість авторів вказують на значну кореляцію параметрів рухливості CASA (зокрема відсоток рухомих спермій, VAP, VCL), а також зміни цих параметрів впродовж 6 год інкубації з репродуктивною здатністю статевих клітин [38, 4, 43].

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 в 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 [7]. АТФ у сперміях утворюється за допомогою комбінації метаболічних шляхів, охоплюючи окисне фосфорилування і цикл Кребса в мітохондріях середньої частини та гліколіз у головній частині джгутика. У процесі заморожування сперми виникають кріопошкодження, які знижують рухливість сперміїв, що окремі автори [26] пояснюють порушенням функції мітохондрій.

Експериментально доведено, що спермії барана залежать насамперед від окисного фосфорилування для виробництва АТФ [9, 10]. У зв'язку з цим, важливо оцінити стан окисного фосфорилування у сперміях як важливого фактора 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 [49], що вказує на відсутність міжвидової різниці у дії наносполук досліджуваних металів.

Додавання наноцитрату Mn і Zn в оптимальній дозі 5,0 мкг/л до середовища для кріоконсервування сперми баранів (ЛЖТЦГС) вірогідно ( $P < 0,05 - 0,01$ ) підвищує активність деконсервованих сперміїв, одночасно знижуючи морфологічні пошкодження статевих клітин, зменшує кількість дегенерованих сперміїв та з ушкодженими акросомами, збільшує кінематичні параметри (CASA), а також підвищує дихальну та інгібує відновну активність сперміїв. Водночас додавання наноцитрату Cu у зростаючих дозах до ЛЖТЦГС знижує перелічені вище показники (крім ушкоджень сперміїв), підвищує відсоток дегенеративних сперміїв, збільшує морфологічні порушення статевих клітин, що вказує на негативний вплив наночастинок цього мікроелемента.

## Джерела

- 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 (S4): 32–40. DOI: 10.1111/rda.13523.
- Benson JD, Woods EJ, Walters EM, Critser JK. The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenol.* 2012; 78 (8): 1682–1699. DOI: 10.1016/j.theriogenol.2012.06.007.
- Borisevich VB, Kaplunenko VG, Kosinov MV. *Nanomaterials in Biology. Fundamentals of nanoveterinary medicine.* Kyiv, Avicenna. 2010: 416 p. (in Ukrainian)
- 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 MR. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. *Anim. Reprod. Sci.* 2013; 138 (1–2): 102–109. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2013.02.007.
- Eghbali M, Alavi-Shoushtari SM, Asri Rezaii S. Effects of copper and superoxide dismutase content of seminal plasma on buffalo semen characteristics. *Pak. J. Biol. Sci.* 2008; 11 (15): 1964–1968. DOI: 10.3923/pjbs.2008.1964.1968.
- 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.
- Freitas MJ, Vijayaraghavan S, Fardilha M. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biol. Reprod.* 2016; 96 (1): 2–12. DOI: 10.1095/biolreprod.116.144337.
- Gandini L, Lombardo F, Lenzi A, Spanò M, Dondero F. Cryopreservation and sperm DNA integrity. *Cell Tiss. Bank.* 2006; 7: 91–98. DOI: 10.1007/s10561-005-0275-8.
- Gibb Z, Griffin RA, Aitken RJ, De Iulius GN. Functions and effects of reactive oxygen species in male fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 2020; 220: 106456. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2020.106456.
- Gibb Z, Lambourne SR, Aitken RJ. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. *Biol. Reprod.* 2014; 91 (3): 77. DOI: 10.1095/biolreprod.114.118539.
- Gulich MP, Yemchenko NL, Kharchenko OO, Yashchenko OV, Tomashevskaya LA, Antomonov MI. *Nanotechnology Products: Citrates of Bioelements (Chemical Characteristics, Biological Action, Scope).* Kyiv, Medinform, 2018: 202 p. (in Ukrainian)
- 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.
- Iskra RY, Vlizlo VV, Fedoruk RS, Antonyak GL. *Chromium in Animal Nutrition.* A monograph. Kyiv, Agrarian Science. 2014: 312 p. (in Ukrainian)
- Kaplunenko VG, Avdosjeva IK, Pashchenko AG. The real prospects of drawing on accomplishments of nanotechnologies in veterinary practice. *Sci. Tech. Bull. SSRICVMPFA IAB.* 2014; 15 (4): 252–260. Available at: <https://www.scivp.lviv.ua/wp-content/uploads/2021/09/51-3.pdf> (in Ukrainian)
- 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.theriogenol.2018.12.017.
- Kornyat S, Sharan M, Ostapiv D, Korbeckij A, Jaremchuk I, Andrushko O. Quality of deconserved bull sperm for the action of nanosuccinates Zn, Cu and Mn in the diluents. *Biol. Tvarin.* 2021; 23 (1): 23–29. DOI: 10.15407/animbiol23.01.023. (in Ukrainian)
- Kornyat S, Yaremchuk I, Andrushko O, Ostapiv D, Sharan M, Chajkovska O. The intensity of the oxidation processes in the sperm of the boar at the add of metal nanosuccinates to the ecosperm medium. *Sci. Tech. Bull. SSRICVMPFA.* 2019; 20 (2): 352–357. DOI: 10.36359/scivp.2019-20-2.46. (in Ukrainian)
- Kosinov MV, Kaplunenko VG. Method for metal carboxylates obtaining "Nanotechnology of obtaining metal carboxylates". Patent of Ukraine no. 38391. publ. 12.01.2009. Bull. No 1, 2009. Available at: <https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=128062> (in Ukrainian)
- Kuzmina N, Ostapiv D, Huleuk N, Gumeneckiy I. The activity and content of SOD isoforms in mail ejaculates and survival of spermatozoa. *Mess. IFNUL Biol. Ser.* 2012; 59: 44–51. Available at: <http://publications.lnu.edu.ua/bulletins/index.php/biology/article/view/8506> (in Ukrainian)
- Kuzmina NV, Ostapiv DD. Isoferments SOD in diluted bull ejaculates. *Anim. Breed. Gen.* 2010; 44: 107–108. (in Ukrainian)
- 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.
- Maulana T, Said S. Kinematics motility of frozen-thawed X and Y sperm of Sumba Ongole bull. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 2019; 387: 012030. DOI: 10.1088/1755-1315/387/1/012030.
- Nagata MPB, Egashira J, Katafuchi N, Endo K, Ogata K, Yamanaoka 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. DOI: 10.1186/s40104-019-0395-9.

24. Nakada K, Sato A, Yoshida K, Morita T, Tanaka H, Inoue SI, Yonekawa H, Hayashi JI. Mitochondria-related male infertility. *PNAS*. 2006; 103 (41): 15148–15153. DOI: 10.1073/pnas.0604641103.
25. 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. *Theriogenol*. 2008; 69 (4): 513–522. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.12.003.
26. O'Connell M, McClure N, Lewis SEM. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum. Reprod*. 2002; 17 (3): 704–709. DOI: 10.1093/humrep/17.3.704.
27. 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.2017.6.11.026.
28. Palacín I, Vicente-Fiel S, Santolaria P, Yániz JL. Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram. *Small Rum. Res*. 2012; 112 (1–3): 128–135. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2012.12.014.
29. 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. *Sci. Horizons*. 2022; 25 (8): 67–74. DOI: 10.48077/scihor.25(8).2022.67-74.
30. Rokotianska VO. The effect of nanoacquelates on the biological usefulness of spermatozoons. *Bull. Agr. Sci. Black Sea Reg*. 2018; 3: 56–60. DOI: 10.31521/2313-092X/2018-3(99)-9. (in Ukrainian)
31. Rowe MP, Powell JG, Kegley EB, Lester TD, Rorie RW. Effect of supplemental tracemineral source on bull semen quality. *Appl. Anim. Sci*. 2014; 30 (1): 68–73. DOI: 10.15232/S1080-7446(15)30085-1.
32. Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci*. 1995; 34 (3–4): 185–249. DOI: 10.1016/0378-4320(94)01327-1.
33. Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci*. 2000; 62 (1–3): 77–111. DOI: 10.1016/S0378-4320(00)00155-X.
34. Sengupta P. Environmental and occupational exposure of metals and their role in male reproductive functions. *Drug Chem. Toxicol*. 2013; 36 (3): 353–368. DOI: 10.3109/01480545.2012.710631.
35. Serdyuk AM, Gulich MP, Kaplunenko VG, Kosinov MV. Nanotechnologies of micronutrients: problems, prospects and ways to eliminate the deficiency of macro- and microelements. *J. Acad. Med. Sci. Ukraine*. 2010; 16 (1): 107–114. (in Ukrainian)
36. Singh A, Kumar A, Bisla A. Computer-assisted sperm analysis (CASA) in veterinary science: A review. *Indian J. Anim. Sci*. 2021; 91 (6): 419–429. DOI: 10.56093/ijans.v91i6.115435.
37. Skrzycki M, Czczot H. Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) — structure, properties and functions. *Postępy Hig. Med. Dośw*. 2004; 58: 301–311. PMID: 15280800. (in Polish)
38. 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 Soc. Anim. Prod*. 1998; 58: 181–185. Available at: <https://www.nzsap.org/proceedings/1998/relationships-between-laboratory-measures-ram-sperm-competence-and-field-fertility>
39. Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum. Reprod. Upd*. 2006; 12 (1): 23–37. DOI: 10.1093/humupd/dmi047.
40. Tekin N, Uysal O, Akçay E, Yavaş İ. Effects of different taurine doses and freezing rate on freezing of row semen. *Ankara Üniver. Vet. Fakült. Dergisi*. 2006; 53 (3): 179–184 DOI: 10.1501/Vetfak\_00000000085. (in Turkish)
41. 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 (3): 383–390. DOI: 10.2754/avb200776030383.
42. Van de Hoek M, Rickard JP, de Graaf SP. Motility assessment of ram spermatozoa. *Biology*. 2022; 11 (12): 1715. DOI: 10.3390/biology11121715.
43. 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 (1–2): 15–20. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2014.02.005.
44. Vlizlo VV, Iskra RY, Fedoruk RS. Nanobiotechnologies. Present state and future prospectes. *Biol. Tvarin*. 2015; 17 (4): 18–29. Available at: <http://aminbiol.com.ua/index.php/106-archive/bt-17-4-2015/1386> (in Ukrainian)
45. Vlizlo VV. (ed.). *Laboratory Methods in Biology, Stockbreeding and Veterinary Medicine*. Lviv, Spolom Publ., 2012: 764 p. (in Ukrainian)
46. Wirth JJ, Mijal RS. Adverse effects of low level heavy metal exposure on male reproductive function. *Syst. Biol. Reprod. Med*. 2010; 56 (2): 147–167. DOI: 10.3109/19396360903582216.
47. Yániz JL, Silvestre MA, Santolaria P, Soler C. CASA-Mot in mammals: An update. *Reprod. Fertil. Dev*. 2018; 30 (6): 799–809. DOI: 10.1071/RD17432.
48. Yaremchuk IM, Sharan MM. Modern opportunities of sperm quality analysis and sperm dose calculation. *Biol. Tvarin*. 2012; 14 (1–2): 697–703. Available at: <http://aminbiol.com.ua/index.php/archive?catid=1:2013-02-15-09-09-13&id=203:2013-03-09-12-31-38> (in Ukrainian)
49. Yaremchuk I, Kuzmina N, Ostapiv D, Sharan M, Kava S. Oxidative processes intensity and quality of bull semen when adding microelements nanosuccinate compounds. *Sci. Mess. LNUVMBT Ser. Vet. Sci*. 2017; 19 (77): 185–189. DOI: 10.15421/nlvvet7740. (in Ukrainian)

## Kinematic parameters and redox state of thawed ram sperm after adding nanocitrate of Mn, Zn, and Cu to the medium for cryopreservation

O. M. Sharan  
oshaom737@gmail.com

Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies of Lviv, 50 Pekarska str., Lviv, 79010, Ukraine

The aim of the work was to find out the effect of adding nanocitrate of Mn, Zn and Cu to the medium for cryopreservation of ram sperm on kinematic indicators and respiratory activity of thawed sperm. The experiment was conducted on six clinically healthy breeder rams of the Texel breed aged 2–4 years. After receiving the ejaculates of the rams, they were evaluated for the volume, concentration and motility of the sperm and were divided into control and experimental groups. Control sperm samples were diluted with lactose-yolk-tris-citrate-glycerol medium (LYTCGM). Nanocitrates of trace elements were added to the medium in experimental samples of ram sperm in the following doses: Zn and Mn — 2.5, 5.0 and 7.5 µg/l, Cu — 1.25, 2.5 and 3.75 µg/l. Diluted sperm was packaged in straws, equilibrated for 2.5 hours and frozen. After thawing of sperm, motility, morphological damage of sperm, kinematic parameters of sperm motility (CASA), oxidation and reduction activity of sperm were determined. A dose-dependent effect of Mn, Zn, and Cu nanocitrates upon their addition to LYTCGM was established. The addition of Mn and Zn nanocitrate at a dose of 5.0 µg/l to LYTCGM significantly ( $P < 0.05–0.01$ ) increases the activity of thawed ram sperm, while the addition of Cu nanocitrate in increasing doses significantly reduces the motility of sperm in thawed ram sperm. Addition of Mn and Zn nanocitrate in an optimal dose of 5.0 µg/l to LYTCGM significantly ( $P < 0.05–0.01$ ) reduces the number of spermatozoa degenerated and with damaged acrosomes, and with the addition of Cu nanocitrate in increasing doses, morphological disorders of germ cell significantly increase cells. The addition of Mn and Zn nanocitrate at a dose of 5.0 µg/l to LYTCGM significantly ( $P < 0.01–0.001$ ) increases the kinematic parameters of thawed ram sperm, and the addition of Cu nanocitrate in increasing doses significantly reduces the indicators of germ cell motility. The addition of Mn and Zn nanocitrates to the medium for cryopreservation of ram sperm increases the oxidation and inhibits the reduction activity of thawed sperm. Addition of Cu nanocitrate to LYTCGM in increasing doses reduces the oxidation and increases the reduction activity of thawed ram sperm.

**Key words:** ram, sperm, Mn, Zn, Cu nanocitrate, kinematic parameters, motility, respiratory activity