

Особенности прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза в сперме хряков-производителей при коррекции минерального питания

С. А. Усенко¹, А. М. Шостя¹, Г. А. Бирта², В. Г. Слинько¹, Е. В. Чухлиб¹

¹Полтавская государственная аграрная академия, г. Полтава, Украина,

²Полтавский университет экономики и торговли, г. Полтава, Украина

Решение проблемы хранения цельной и разбавленной спермы направлено на раскрытие особенностей процессов метаболизма при переходе спермиев к естественному состоянию анабиоза и создание программ их активации, что значительно расширит возможности метода искусственного осеменения свиней. Микроэлементы в сперме хряков-производителей осуществляют активное воздействие на подвижность спермиев путем регулирования интенсивности перекисного окисления и системы антиоксидантной защиты.

Цель исследований заключалась в установлении особенностей прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза в сохраненной сперме хряков-производителей при скармливании лактатов микроэлементов.

В исследовании использованы взрослые хряки-производители крупной белой породы. Продолжительность эксперимента составляла 120 суток, в том числе три периода: подготовительный - 30, основной - 60 (скармливания лактатов цинка, селена, меди и железа) и заключительный - 30 суток. В основном периоде опыта рацион животных контрольной группы оставался без изменений, а в двух опытных - с добавкой лактатов цинка, селена, меди и железа в виде наноаквахелатов. Уровень биологически активных компонентов в рационе этих групп был выше на 10 % и 20 % по сравнению с контрольной группой. Образцы эякулятов (100 мл) хранили при температурах: +38 °С, +17 °С и +5 °С в течение 24 часов. Состояние прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза в эякуляте оценивали по содержанию диеновых конъюгатов, ТБК-активных комплексов, восстановленного глутатиона, витамина А, витамина Е, аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот, активностями супероксиддисмутазы и каталазы.

Установлено, что скармливание лактатов цинка, селена, меди и железа в составе рациона хряков-производителей существенно изменяет прооксидантно-антиоксидантный гомеостаз в эякуляте после 24-х часового хранения при различных температурных режимах. Протекание процессов перекисидации в инкубированной сперме при температуре +38 °С происходит интенсивно, до +17 °С - замедляется, а при снижении до +5 °С - тормозится в 2-3 раза.

Количество скармливаемых лактатов микроэлементов хрякам-производителям определяет изменение состояния прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза в сперме. Добавление данных наноаквахелатов в дозе на 10 % больше нормы, в течение 60-ти суток стимулирует активность антиоксидантных ферментов, увеличивает концентрацию низкомолекулярных антиоксидантов - восстановленного глутатиона, витаминов А, Е и аскорбиновой кислоты. Указанные биологические эффекты в изменении прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза продолжают не менее месяца после коррекции минерального питания.

Скармливание хрякам-производителям лактатов микроэлементов на 20 % сверх нормы, по сравнению с группой, получавшей на 10 % выше их количества, ускоряет процессы перекисидации при хранении спермы ($t = +17$ и $+38$ °С), где максимально возможная межгрупповая разница преобладания содержания диеновых конъюгатов ($p < 0,05-0,01$) наблюдается на 60-е сутки применения и длится не менее месяца. Такие изменения происходят на фоне интенсивного использования витамина А ($p < 0,01$), витамина Е ($p < 0,01$), аскорбиновой кислоты ($p < 0,05-0,01$) и активации супероксиддисмутазы и каталазы ($p < 0,05$), что продолжается до 60-го дня применения добавки микроэлементов.

Ключевые слова: сперма, перекисидация, микроэлементы, каталаза, витамины, ТБК-активные комплексы, наноаквахелаты.

Особливості прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу у спермі кнурів-плідників за корекції мінерального живлення

С. О. Усенко¹, А. М. Шостя¹, Г. О. Бірта², В. Г. Слинько¹, Є. В. Чухліб¹

¹Полтавська державна аграрна академія, м. Полтава, Україна,

²Полтавський університет економіки і торгівлі, м. Полтава, Україна

Встановлено, що додаткове згодовування лактатів цинку, селену, міді і заліза кнурам-плідникам в дозі на 10 % більше норми стимулює у спермі активність антиоксидантних ензимів, збільшує концентрацію низькомолекулярних антиоксидантів, а в дозі 20 % прискорює процеси перекисидції та знижує вміст вітаміну А, вітаміну Е і аскорбінової кислоти.

Ключові слова: сперма, перекисидация, мікроелементи, каталаза, вітаміни, ТБК-активні комплекси, наноаквахелати.

Вступ

Актуальність теми. Проблемі зберігання цільної та розрідженої сперми присвячена значна кількість наукових досліджень, які спрямовані на розкриття особливостей процесів обміну у цих тканинах поза організмом та цілісності акросомального апарату

сперміїв (Liu et al., 2019). Розроблення фізіологічних способів, направлених на перехід сперміїв до природного стану анабіозу – умов коли їх зрілі форми тривалий час зберігаються у сім'яниках та створення програм активування до руху цих гамет, значно розширить можливості методу штучного осіменіння

свиней. Регулювання температури зберігання сперми дає можливість змінювати метаболічні перетворення у сперміях залежно від їх стану – неповного чи глибокого анабіозу. Особливої уваги заслуговує зберігання сперми в умовах часткового анабіозу за позитивних температур, коли обмін речовин у сперміях сповільнюється. Найчастіше для короткотермінового зберігання сперми використовують температуру +17°C (Kumaresan et al., 2009). Подальше зниження температури до +5°C значно гальмує процеси дихання, однак після відтавання спермів їх рухливість, виживаність, а головне запліднююча здатність швидко знижуються (Gaczarzewicz, Udała, Piasecka, Błaszczyk, & Stankiewicz, 2015).

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Дані експериментів свідчать, що мікроелементи в спермі кнурів-плідників здійснюють активний вплив на рухливість спермів шляхом регулювання окисно-відновних реакцій. Тривале зберігання сперми при температурах від нульової до кімнатної є досить обмеженим через зниження запліднювальної здатності спермів, зростання надмірної кількості активних форм кисню та пошкодження їх акросоми (Kumaresan et al., 2009). Окремі експерименти свідчать, що зберігання сперми за температури +5°C суттєво гальмує перебіг процесів пероксидації, що очевидно відбувається за рахунок максимальної активності антиоксидантних ензимів (Kankofer, Kolm, Aurich, & Aurich, 2005). Найбільший вплив на процеси рухливості і збереження цілісності мембран спермів здійснюють глутатіонпероксидаза та каталаза (Pagl, Aurich, & Kankofer, 2006).

Серед мікроелементів, які визначають продуктивність тварин провідна роль належить цинку, селену, міді та залізу. Ці речовини регулюють ріст, розвиток та відтворення свиней (Peters, Mahan, Wiseman, & Fastinger, 2010; Jelezarsky, Vaisberg, Chaushev, & Sapundjiev, 2008; Yinghui et al., 2019). Більшість зазначених біологічних ефектів супроводжуються змінами прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу через лабільність активностей антиоксидантних ензимів – супероксиддисмутази (активний центр містить – Zn, Cu) каталази (активний центр містить – Fe), та глутатіонпероксидази (активний центр містить – Se).

З'ясована важлива роль антиоксидантних ензимів у забезпеченні функціональної активності спермів та розвитку окислювального стресу. Так додаткове уведення супероксиддисмутази до зразків сперми, що зберігалась, інгібує пероксидне окиснення вірогідно негативно корелюючи із рухливістю і виживаністю спермів. Активність вказаного ензиму рекомендовано використовувати як індикативний показник якості еякулятів для зберігання (Pipan et al., 2017). Інкубування спермів із доданою каталазою істотно не змінює концентрацію вільного кисню, але істотно зменшує кількість пероксиду гідрогену при заморожуванні та розморожуванні спермодоз (Kim, Lee, Kang, & Kim, 2011).

Результати досліджень вітчизняних і закордонних науковців свідчать про позитивний вплив мікроелементів на поліпшення якості спермопродукції – концентрацію, рухливість і виживання спермів (Nenkova, Petrov, & Alexandrova, 2017; Sutovsky, Kerns, Zigo, & Zuidema, 2019; Pipan et al., 2017). Такі особливості формування статевої функції супроводжуються глибокими змінами прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу кнурів-плідників.

Викладені результати вищенаведених експериментів свідчать про необхідність розроблення технологій коротко- і довготривалого збереження

високої функціональної активності спермів. Однак залишаються мало дослідженими режими зберігання сперми та спермодоз через значну лабільність процесів пероксидації, інтенсивність перебігу яких часто є визначальною у формуванні відтворювальної здатності тварин (Shostia et al., 2018).

Мета роботи – вивчення особливостей прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу (ПАГ) в інкубованій спермі кнурів-плідників при згодовуванні лактатів мікроелементів.

Завданням дослідження було з'ясувати вплив згодовуваних лактатів мікроелементів на інтенсивність процесів пероксидації та систему антиоксидантного захисту за різних режимів зберігання нативної сперми кнурів-плідників.

Матеріали і методи досліджень

Дослідження виконано в умовах лабораторії фізіології відтворення Інституту свинарства і агропромислового виробництва НААН та племінного заводу з розведення свиней великої білої породи ДП ДГ «Степне» ІС і АПВ НААН. Для експерименту були відібрані 9 дорослих кнурів-плідників великої білої породи віком від 18 до 36 місяців. За якістю спермопродукції були сформовані три групи-аналоги тварин – I (контрольна) та II і III (дослідні), по три кнури-плідники у кожній. Отримані зразки еякулятів (100 мл) зберігали за температур: +38 °C, +17 °C та +5 °C протягом 24-х годин.

Дослідження проводили за методом груп. Тривалість експерименту становила 120 діб, у тому числі: підготовчий період – 30, основний – 60 (згодовування лактатів цинку, селену, міді і заліза) і заключний – 30 діб. В основному періоді дослідів раціон тварин контрольної групи залишався без змін, а двох дослідних – з додавкою рідких лактатів цинку, селену, міді і заліза виробництва ТОВ «Наноматеріали і нанотехнології» (м. Київ). Рівень біологічно активних компонентів у раціоні другої і третьої дослідних груп був вищим відповідно на 10 % і 20 % порівняно з контрольною групою.

Інтенсивність перебігу процесів пероксидного окиснення у спермі визначали за концентраціями дієнових кон'югатів - спектрофотометрично (Navrylov, & Melkorudnaia, 1983) і ТБК-активних комплексів (альдегіди і кетони) – фотоелектроколориметрично (Kaidashev, 1996). Стан системи антиоксидантного захисту оцінювали за активностями супероксиддисмутази (СОД) (Brusov, Herasymov, & Panchenko, 1976) та каталази (КТ) (Koroliuk, Yvanova, Maiorova, & Tokarev, 1988), кількістю відновленого глутатіону (Shabunyn, 2010), вітаміну А, вітаміну Е (Kovalenko, Shostia, & Usenko, 2004), аскорбінової і дегідроаскорбінової кислот (Kaidashev, 1996).

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

Результати дослідження та їх обговорення

Дані досліджень свідчать про те, що у інкубованій спермі впродовж 24-х годин за температури +38 °C від кнурів-плідників II групи, порівняно із інтактними тваринами, відбувалось незначне зниження вмісту первинних продуктів пероксидного окиснення протягом експерименту на 15,7 % (60-а доба) і 16,4 % (заключний період) (табл.1.). Підвищення кількості згодовуваної мінеральної добавки до 20 % істотно впливало на перерозподіл концентрацій ДК у цій тканині,

а саме їх більший вміст у тварин III групи порівняно з II групою, де максимальна різниця становила – 53,7 % на 60-ту добу вживання та 43,0 % після завершення дослідження. Виявлено найбільшу різницю за кількістю ТБК-активних речовин у спермі після закінчення

основного і заключного періодів, де вміст цих сполук порівняно з контрольною групою був нижчим відповідно на 19,0 % та 18,5 % у II-й групі та 14,0 та 13,6 % у III-й групі.

Таблиця 1

Вплив лактатів мікроелементів на процеси пероксидного окиснення у спермі кнурів протягом 24-х годинного зберігання, М ± m, n=6

Показники	Групи	Підготовчий період	Основний період		Заключний період
			30-доба	60-доба	
Дієнові кон'югати, мкмоль/л	t = +38 °C				
	I	10,28+1,39	12,43+1,61	14,62+1,74	12,80+1,27
	II	10,17+1,51	11,08+1,09	12,32+2,99	10,73+2,47
	III	8,85+1,36	13,62+2,04	18,93+2,79	15,28+3,54
	t = +17 °C				
	I	6,38+0,67	5,52+0,93	7,15+1,19	7,43+0,69
	II	5,95+0,47	4,91+0,62	3,93+0,38	4,40+0,68
	III	6,56+1,12	7,22+1,18	9,23+0,64	9,07+1,10
	t = +5 °C				
	I	2,87+0,52	3,12+0,49	3,29+0,60	2,88+0,20
	II	3,08+0,32	2,92+0,26	2,18+0,30	2,05+0,27
	III	2,57+0,37	4,75+0,64	5,24+0,65	4,82+0,59
ТБК-активні сполуки, мкмоль/л	t = +38 °C				
	I	39,42+4,83	41,88+6,01	43,75+6,63	42,71+5,42
	II	40,91+4,65	44,83+5,14	35,47+5,97	34,78+5,49
	III	37,73+5,56	44,42+4,37	37,66+3,81	36,90+6,54
	t = +17 °C				
	I	27,75+5,04	29,52+3,31	26,73+3,44	28,18+3,73
	II	30,21+4,61	26,68+4,23	22,37+3,46	23,83+3,35
	III	25,43+4,13	29,31+2,82	33,17+6,62	31,83+4,19
	t = +5 °C				
	I	15,27+2,38	17,3+1,56	18,83+1,54	19,17+2,20
	II	17,05+3,11	13,43+1,82	10,52+1,50	10,38+0,96
	III	16,82+1,83	11,23+2,21	9,17+0,93	12,38+1,43
ТБК-активні сполуки після інкубування мкмоль/л	t = +38 °C				
	I	45,80+5,56	48,23+3,91	49,65+5,33	44,43+4,96
	II	47,62+5,23	46,58+5,92	40,13+7,01	40,97+4,70
	III	50,17+5,83	49,40+6,07	53,07+4,17	39,18+6,03
	t = +17 °C				
	I	32,18+3,56	35,17+3,46	34,22+2,24	30,25+4,04
	II	34,25+4,29	31,16+4,82	26,43+5,49	28,62+4,68
	III	30,17+4,43	32,42+4,97	38,10+4,95	34,68+4,13
	t = +5 °C				
	I	20,42+4,41	24,70+5,49	22,93+4,58	21,55+5,80
	II	22,80+3,90	19,63+3,52	14,11+1,72	12,83+2,49
	III	22,58+3,86	26,17+2,84	10,77+2,02	11,43+1,50

Примітка: * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001 – порівняно з першою групою (контролем); n – кількість досліджуваних зразків.

Зниження температури інкубування сперми тварин II групи до +17°C супроводжувалось інгібуванням утворення первинних і вторинних продуктів пероксидного окиснення, де їх кількість була нижчою відповідно на 10,4 і 9,8 (30-а доба), 45,5 і 16,5 (60-а доба) та 29,0 і 18,6 (заключний період). Підвищення концентрації наноаквахелатів на 20 % у раціоні понад норму стимулювало перебіг пероксидного окиснення - переважання кількості ДК і ТБК-активних речовин у тварин III-ї групи порівняно з II-ю групою впродовж досліджуваних періодів у 1,5 і 1,1 рази (30-а

доба), 2,3 (p<0,001) і 1,4 рази (60-а доба) та 2,3 (p<0,05) і 1,3 рази (заключний період).

Інкубування сперми в умовах зниженої температури до +5°C істотно сповільнювало утворення ДК. При цьому, у зразках сперми кнурів-плідників II-ї групи, що споживали незначну кількість мінеральної добавки, порівняно із III-ю групою по закінченні основного і заключного періодів концентрація цих речовин була нижчою відповідно у 2,4 (p<0,01) та 2,3 (p<0,001) (p<0,01) рази. Вміст ТБК-активних комплексів у зразках сперми тварин II та III груп протягом експерименту був істотно меншим у 1,3 і 1,5 рази (30-а

доба), 1,8 і 2,1 рази (60-а доба) та 1,8 і 1,6 рази (заключний період), порівняно з інтактними тваринами. Викладені особливості перебігу процесів пероксидації в умовах охолодження, очевидно, обумовлені появою адаптаційно-компенсаторних реакцій у сперміях, що супроводжуються конформаційними змінами – появою значної кількості подвійних зав'язків у ліпідному шарі їх мембран.

Активність ензимних антиоксидантів у зразках сперми кнурів-плідників протягом дослідного періоду коливалась залежно від температури зберігання та дози згодовуваних лактатів (табл. 2). Так у цій тканині тварин контрольної групи рівень СОД змінювався несуттєво впродовж 24-х годинного інкубування при $t=+38^{\circ}\text{C}$. Активність вказаного ензиму в спермі тварин II

і III груп була нижчою відповідно в 1,4 і 1,6 рази на 60-ту добу основного періоду, а також в 1,5 та 2,4 ($p<0,05$) рази після закінчення експерименту, порівняно з інтактними тваринами. При зниженні температури інкубування зразків до $+17^{\circ}\text{C}$ встановлена закономірність зберігалась, однак, максимальний рівень СОД було зареєстровано у тварин III-ї групи. Зниження температури середовища до $+5^{\circ}\text{C}$ супроводжувалось загальним зменшенням рівня цього ензиму, однак, найвища її функціональна активність була характерною у зразках II-ї групи. Отримана динаміка СОД вказує на провідну її роль у формуванні ПАГ та суттєвий вплив згодовуваних мікроелементів на процеси пероксидації, що підтверджується даними експериментів (Piran et al., 2014).

Таблиця 2

Вплив лактатів мікроелементів на систему антиоксидантного захисту у спермі кнурів-плідників після 24-х годин зберігання, $M \pm m$, $n=6$

Показники	Групи	Підготовчий період	Основний період		Заключний період
			30-доба	60-доба	
Супероксиддисмутаза, у.о./мл	t = +38 ^o C				
	I	0,462±0,089	0,517±0,115	0,490±0,086	0,533±0,095
	II	0,511±0,084	0,533±0,061	0,328±0,070	0,355±0,047
	III	0,428±0,068	0,342±0,038	0,318±0,058	0,223±0,052
	t = +17 ^o C,				
	I	0,575±0,083	0,608±0,095	0,542±0,114	0,617±0,089
	II	0,583±0,109	0,752±0,090	1,053±0,107	0,935±0,097
	III	0,528±0,112	0,825±0,169	1,382±0,184	1,083±0,139
	t = +5 ^o C,				
	I	0,355±0,039	0,362±0,052	0,290±0,062	0,335±0,089
	II	0,422±0,074	0,461±0,085	0,470±0,103	0,381±0,053
	III	0,365±0,058	0,382±0,079	0,331±0,039	0,323±0,069
Каталаза, 2 O ₂ /хв./л	t = +38 ^o C,				
	I	9,17±1,51	10,25±1,91	8,37±1,32	9,83±1,54
	II	11,28±1,46	9,50±1,59	12,17±2,20	14,31±2,72
	III	10,55±1,57	15,92±1,84	18,83±2,61	21,88±4,46
	t = +17 ^o C,				
	I	6,33±1,11	7,37±1,43	6,82±1,26	7,95±1,01
	II	5,55±1,19	9,27±0,89	10,33±1,37	11,82±1,43
	III	4,91±0,94	10,28±1,49	11,82±1,06	10,40±1,54
	t = +5 ^o C,				
	I	3,12±0,51	4,53±0,67	3,08±0,39	3,55±0,47
	II	2,82±0,37	5,83±0,70	7,02±1,09	6,17±0,91
	III	3,57±0,38	8,50±0,91	8,72±1,78	5,16±1,01

Примітка: * - $p<0,05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0,001$ – порівняно з першою групою (контролем);
n – кількість досліджуваних зразків.

У процесі моделювання умов перебування спермій у статевих шляхах свиноматок встановлено, що активність КТ у спермі кнурів-плідників II і III груп була вищою після завершення основного періоду, відповідно у 1,4 і 2,3 ($p<0,05$) рази, а також після закінчення експерименту – у 1,5 і 2,2 рази ніж у контрольній групі. Динаміка зростання рівня вказаного ензиму у тварин, що вживали мінеральну добавку, зберігалась і при інкубуванні зразків при нижчих температурах. Функціональна активність КТ у зразках

істотно збільшувалась із підвищенням температури середовища

Інкубування за температури $+38^{\circ}\text{C}$ зразків сперми, отриманих від кнурів-плідників II груп, супроводжувалось менш інтенсивним окисненням глутатіону, тобто вміст його відновленої форми був вищим за контрольну на 26,2 % після 30-ї доби та 64,7 % після закінчення 60-ї доби вживання мінеральної добавки (табл. 3). Така тенденція зберігалась до закінчення експерименту.

Вплив лактатів мікроелементів на вміст неензимних антиоксидантів у спермі кнурів після 24-х годинного зберігання, $M \pm m$, $n=6$

Показники	Групи	Підготовчий період	Основний період		Заключний період
			30-доба	60-доба	
Відновлений глутатіон, мкмоль/л	t = +38°C				
	I	0,233+0,036	0,215+0,032	1,717+0,159	0,205+0,023
	II	0,265+0,035	0,272+0,039	0,289+0,025	0,235+0,039
	III	0,242+0,039	0,197+0,024	0,238+0,036	0,195+0,022
	t = +17°C				
	I	0,317+0,043	0,332+0,035	0,325+0,031	0,342+0,046
	II	0,325+0,046	0,367+0,031	0,392+0,039	0,373+0,045
	III	0,282+0,54	0,258+0,039**	0,232+0,040**	0,243+0,038
	t = +5°C				
	I	0,398+0,047	0,363+0,051	0,358+0,049	0,388+0,062
	II	0,358+0,039	0,385+0,051	0,393+0,046	0,453+0,067
	III	0,438+0,078	0,292+0,046	0,241+0,039	0,342+0,024
Аскорбінова кислота, ммоль/л	t = +38°C				
	I	3,95+0,47	3,67+0,66	3,38+0,29	4,22+0,78
	II	3,13+0,55	5,08+0,53	6,25+0,92	5,78+1,27
	III	4,42+0,61	4,88+0,90	2,53+0,47***	2,67+0,52
	t = +17°C				
	I	4,23+0,89	4,02+0,73	4,75+0,31	5,58+0,62
	II	5,32+0,85	6,08+0,82	6,58+1,07	7,37+1,43
	III	5,05+0,68	3,57+0,25	2,92+0,53	3,23+0,46*
	t = +5°C				
	I	7,68+0,62	6,27+0,36	7,92+0,53	8,33+0,36
	II	8,32+0,73	5,45+0,59	7,53+0,81	10,85+0,78
	III	8,05+1,22	3,37+0,49	4,75+0,54	5,08+1,05
Дегідроаскорбінова кислота, ммоль/л	t = +38°C				
	I	5,75+0,73	5,03+0,67	6,38+0,96	8,05+1,26
	II	4,61+0,52	4,07+0,82	2,83+0,44	3,72+0,51
	III	5,37+0,63	7,42+0,83	8,50+1,06**	9,27+1,43
	t = +17°C				
	I	6,55+0,47	5,72+0,70	6,10+0,38	7,32+1,11
	II	6,08+0,99	6,33+1,35	4,37+1,08	5,48+1,09
	III	7,67+0,86	9,82+1,36	11,18+1,65	8,61+1,87
	t = +5°C				
	I	9,03+1,39	8,50+1,57	9,72+1,85	10,38+1,42
	II	6,67+1,09	8,08+1,25	7,32+0,81	7,16+1,72
	III	9,42+1,54	9,75+0,96	11,73+1,76	12,88+2,54
Вітамін А ммоль/л	t = +38°C				
	I	0,628+0,089	0,518+0,078	0,708+0,151	0,758+0,087
	II	0,583+0,106	0,942+0,161	0,808+0,067	0,930+0,129
	III	0,725+0,138	0,433+0,084	0,360+0,083***	0,252+0,043***
	t = +17°C				
	I	1,240+0,105	1,817+0,192	1,508+0,140	1,342+0,117
	II	1,375+0,157	1,442+0,114	1,958+0,184	1,892+0,249
	III	1,117+0,170	0,875+0,102	0,808+0,122**	0,930+0,218*
	t = +5°C				
	I	1,975+0,139	2,235+0,299	2,050+0,138	1,828+0,241
	II	1,642+0,100	2,628+0,290	2,433+0,266	2,042+0,107
	III	1,783+0,242	1,66+0,192*	1,392+0,202	1,792+0,269
Вітамін Е, ммоль/л	t = +38°C				
	I	1,05+0,22	1,32+0,29	1,40+0,25	0,45+0,15
	II	0,975+0,179	0,841+0,149	1,683+0,231	1,350+0,268
	III	1,375+0,261	0,417+0,138	0,450+0,083	0,608+0,125
	t = +17°C				
	I	2,15+0,26	1,74+0,13	1,93+0,34	1,88+0,21
	II	1,87+0,28	2,62+0,35	2,73+0,32	2,70+0,38
	III	1,92+0,16	1,36+0,23	1,15+0,19***	1,31+0,23*
	t = +5°C				
	I	2,95+0,23	2,63+0,14	2,52+0,39	2,23+0,18
	II	3,04+0,26	2,95+0,33	2,74+0,29	3,12+0,39
	III	2,67+0,23	2,21+0,24	1,82+0,44	1,94+0,37

Примітка: - $p < 0,05$; * - $p < 0,01$; ** - $p < 0,001$ – порівняно з першою групою (контролем);
- $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$; ### - $p < 0,001$ – порівняно з другою групою; n – кількість досліджуваних зразків.

Встановлено, що добове збереження зразків сперми за кімнатних температурних умов (+17 °C) мінімізувало рівень відновленого глутатіону у еякулятах від тварин III групи, а у тварин II-ї групи інгібувало його окиснення, де різниця між ними, після закінчення першого і другого місяців вживання мінеральної добавки, становила відповідно 44,0 ($p < 0,01$) та 69,5 ($p < 0,01$) %. Така закономірність зберігалась щонайменше 30 діб зі зменшенням міжгрупової різниці концентрації за цією речовиною. Зниження температури інкубування зразків до +5 °C супроводжувалось гальмуванням окиснення глутатіону у зразках II-ї групи, а також його максимальним використанням у III-й групі, особливо в період згодовування мінеральної добавки.

Концентрація аскорбінової кислоти у еякулятах дослідних груп після зберігання за температури +38 °C протягом 24-х годин змінювалась з деякими особливостями. Так, після закінчення основного і заключного періодів, у зразках тварин II групи вміст цієї кислоти був вищим, порівняно із III-ю групою, відповідно у 2,5 ($p < 0,01$) та 2,2 рази, що очевидно обумовлено її окисненням до ДАК.

Добове зберігання сперми кнурів-плідників III групи за температури +17 °C призводило до істотного використання АК - зменшення її кількості протягом основного на 12,5 % (30-та доба), 38,3 % (60-та доба), також заключного періодів - 42,9 % порівняно з контрольною групою. Найбільшу міжгрупову різницю за вмістом АК спостерігали між зразками тварин, що споживали мінеральну добавку на 10 % та 20 % понад норму, де у перших кількість цієї кислоти переважала над другими на 30-ту добу у 1,7 ($p < 0,05$) рази, і 60-ту добу вживання - 2,3 ($p < 0,05$) рази, такий розподіл її концентрацій спостерігався і в заключний період. Ці зміни супроводжувались підвищенням кількості ДАК, особливо у еякулятах тварин III групи. Проте, інкубація зразків цієї тканини в умовах мінімальної температури істотно не впливала на міжгрупову різницю концентрацій АК і ДАК, де вміст окисненої форми переважав у тварин, що отримували максимальну кількість мікроелементів.

Додавання мінеральної добавки до раціону кнурів-плідників суттєво впливало на перерозподіл концентрацій вітамінів антиоксидантної дії у спермі. Найбільш виразні зміни спостерігались при зберіганні цієї тканини за температури +38 °C протягом 24 годин, де у зразках III групи вміст вітаміну А і вітаміну Е знижувався відносно контролю відповідно в 1,3 та 1,4 ($p < 0,05$) рази після завершення першого і в 2,0 і 3 ($p < 0,05$) рази другого місяців споживання, така закономірність зберігалась протягом заключного періоду. Максимальним рівнем цих низькомолекулярних антиоксидантів характеризувались тварини II-ї групи, а мінімальним - III-ї групи, де міжгрупова різниця за концентраціями вітаміну А і вітаміну Е була встановлена після завершення другого місяця згодовування мінеральної добавки відповідно в 2,2 ($p < 0,01$) і 3,7 рази, а також у період післядії в 3,6 та 2,1 рази.

Встановлено, що концентрація вітаміну А і вітаміну Е після добового інкубування зразків еякулятів тварин II групи за температури +17 °C була максимальною та значно перевищувала відповідно у 2,5 ($p < 0,01$) і 2,4 ($p < 0,01$) рази на 60-у добу вживання, а також у 2,0 ($p < 0,01$) і 2,1 ($p < 0,05$) рази після завершення заключного періоду порівняно з III-ю групою. Вміст вказаних вітамінів у цій тканині тварин I групи протягом експерименту суттєво не змінювався, коливався в межах середніх значень.

Зниження температури інкубування сперми до +5 °C сприяло збереженню вітамінів антиоксидантної дії.

Однак, у отриманих зразках від тварин II групи концентрація вітаміну А та вітаміну Е була найвищою, а найнижчою у представників III групи, де максимальна різниця між ними була відмічена після першого місяця вживання мінеральної добавки, і складала відповідно - 36,9 ($p < 0,05$) і 25,1 %, другого - 42,8 і 34,3 %, а також після завершення заключного періоду - 12,3 та 37,4 %.

Висновки

1. Згодовування лактатів цинку, магнію, селену, міді і заліза у складі кормосуміші кнурам-плідникам істотно змінює ПАГ у еякулятах після 24-х годинного зберігання за різних температурних режимів. Перебіг процесів пероксидації у інкубованій спермі за температури +38 °C відбувається інтенсивно, за +17 °C - сповільнюється, а при зниженні до +5 °C - гальмується в 2-3 рази.

2. Кількість згодовуваних лактатів мікроелементів кнурам-плідникам визначає зміну стану ПАГ у спермі. Додавання цих наноаквахелатів в дозі на 10 % більше норми, протягом 60-ти діб стимулює активність антиоксидантних ензимів, збільшує концентрацію низькомолекулярних антиоксидантів - відновленого глутатіону, вітамінів А, Е та С. Зазначені біологічні ефекти у зміні ПАГ тривають щонайменше місяць, після корегування мінерального живлення.

3. Згодовування кнурам-плідникам лактатів мікроелементів на 20 % понад норму, порівняно із групою, що отримували на 10 % вищу їх кількість, прискорює процеси пероксидації при зберіганні сперми ($t = +17$ і $+38$ °C), де максимально вірогідна міжгрупова різниця переважання вмісту дієвих кон'югантів ($p < 0,05-0,01$) спостерігається на 60-ту добу вживання та триває щонайменше місяць. Такі зміни відбуваються на тлі інтенсивного використанням вітаміну А ($p < 0,01$), вітаміну Е ($p < 0,01$), аскорбінової кислоти ($p < 0,05-0,01$) та активації СОД і КТ ($p < 0,05$), що триває до 60-ї доби вживання добавки мікроелементів.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть пов'язані з розробленням ефективних програм годівлі кнурів-плідників із використанням хелатних сполук мікроелементів, для підвищення їх відтворювальної здатності.

References

- Brusov, O. S., Herasymov, A. M., & Panchenko, L. F. (1976). Vplynye pryrodnikh ynyhytorov radykalnykh reaktsiy na avtookyslenye adrenalyna. *Biulleten eksperymentalnoi byolohyy u medytsyni*, 1, 33-35. [in Russian]
- Gączarzewicz, D., Udała, J., Piasecka, M., Bbłaszczuk, B., & Stankiewicz, T. (2015). Storage temperature of boar semen and its relationship to changes in sperm plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and oxidoreductive capability. *Turk J. Biol.* 39. 582-594. DOI:10.3906/biy-1412-76
- Havrylov, V. B., & Melkorudnaia, M. Y. (1983). Spektrofotometrycheskoe opredelenye soderzhaniya hydroperekyseli lypydov v plazme krovy. *Laboratornoe delo*, 3, 33-36. [in Russian]
- Jelesarsky, L., Vaisberg, Ch., Chaushev, T., & Sapundjiev, E. (2008). Localization and characterization of glutathione peroxidase (GPx) in boar accessory sex glands, seminal plasma, and spermatozoa and activity of GPx in boar semen. *Theriogenology*, 69(2), 139-45. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.08.016
- Kaidashev, I. P. (1996). *Posibnyk z eksperymentalno-klinichnykh doslidzen z biolohii ta medytsyny*. Poltava. 123-128. [in Ukrainian]
- Kankor, M., Kolm, G., Aurich, J., & Aurich, C. (2005). Activity of glutathione peroxidase, superoxide

- dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 degrees C. *Theriogenology*, 63 (5), 1354-65. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.07.005
- Kim, S., Lee, Y., Kang, T. & Kim, Y. (2011). The reduction of hydrogen peroxide in viable boar sperm cryopreserved in the presence of catalase. *Journal of Veterinary Clinics*, 28(1), 13-19.
- Koroliuk, M. A., Yvanova, L. Y., Maiorova, Y. H., & Tokarev, E. V. (1988). Metod opredeleniya aktyvnosti katalazi. *Laboratornoe delo*, 1, 16-19. [in Russian]
- Kovalenko, V. F., Shostia, A. M., & Usenko, S. O. (2004). *Pat. Ukraina 67054A MPK A61V5/00*. [in Ukrainian]
- Kovalenko, V. F., Shostia, A. M., & Usenko, S. O. (2005). Metodyka vyznachennia vitaminiv A, E i zahalnoho kholesterynu v riznykh tkanyakh svynomatok plodiv. *Suchasni metody v svynarstvi*. Poltava. 114-118. [in Ukrainian]
- Kumaresan, A., Kadirvel, G., Buijarbaruah, K. M., Bardoloi, R. K., Das, A., & Naskar, S. (2009). Preservation of boar semen at 18 °C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 110(1-2), 162-171. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2008.01.006
- Liu, T., Han, Y., Zhou, T., Zhang, R., Chen, H., Chen, S. & Zhao, H. (2019). Mechanisms of ROS-induced mitochondria-dependent apoptosis underlying liquid storage of goat spermatozoa. *Aging (Albany NY)*, 11(18), 7880-7898. DOI: 10.18632/aging.102295
- Nenkova, G., Petrov, L., & Alexandrova, A. (2017) Role of Trace Elements for Oxidative Status and Quality of Human Sperm. *Balkan Med J*, 34(4), 343-348. DOI: 10.4274/balkanmedj.2016.0147
- Pagl, R., Aurich, C., & Kankofer, M. (2006). Anti-oxidative status and semen quality during cooled storage in stallions. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.*, 53(9), 486-9. DOI: 10.1111/j.1439-0442.2006.00879.x
- Peters, J. C., Mahan, D. C, Wiseman, T. G., & Fastinger, N. D. (2010). Effect of dietary organic and inorganic micromineral source and level on sow body, liver, colostrum, mature milk, and progeny mineral composition over six parities. *Journal of Animal Science*, 88. 626-637. DOI: 10.2527/JAS.2009-1782
- Pipan, M. Z., Mrkun, J., Strajn, B. J., Vrtač, K. P., Kos, J., Pišlar, A., & Zrimšek, P. (2017). The influence of macro- and microelements in seminal plasma on diluted boar sperm quality. *Acta Vet Scand.*, 59(1), 11. DOI: 10.1186/s13028-017-0279-y
- Pipan, Z. M., Mrkun, J., Kosec, M., Nemec Svete, A., & Zrimšek, P. (2014). Superoxide Dismutase: A Predicting Factor for Boar Semen Characteristics for Short-Term Preservation. *Biomed Res Int*. DOI: 10.1155/2014/105280
- Shabunyn, S. V. (2010). *Metodycheskye polozenyia po yzucheniu protsessov svobodnoradykalnoho okysleniia v sisteme antyoksydantnoi zashchyty orhanyzma*. Voronezh. 36-37; 51-52. [in Russian]
- Shostia, A. M., Rokotianska, V. O., Tsybenko, V. H., Sokyрко, M. P., Hyria, V. M., Nevidnychyi, O. S., Kaplunenko, V. H., & Pashchenko, A. H. (2018). Vplyv nanoakvakhelativ na yakist spermoproduktsii u knuriv-plidnykiv. *Visnyk Sumskoho natsionalnoho ahramoho universytetu. Serii: Tvarynytstvo*, 7(35), 156-160. [in Ukrainian]
- Sutovsky, P., Kerns, K., Zigo, M., & Zuidema, D. (2019). Boar semen improvement through sperm capacitation management, with emphasis on zinc ion homeostasis. *Theriogenology*, 1(137), 50-55.
- Yinghui, Wu., Zihui, Liu L., Wei, H., Zhou, Y., Tan, J., Sun, H., Li, Sh., & Jiang, S. (2019) Microelements in seminal and serum plasma are associated with fresh