

Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С.З. Гжицького

Факультет харчових технологій та біотехнологій

Кафедра біотехнологій та радіології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на здобуття освітнього ступеня бакалавра

на тему: «Використання макро- і мікроелементів у
розріджувачах еякулятів з метою покращення
фізіологічної якості сперми»

Виконала: студентка 4 курсу,

групи 1, спеціальності

162 «Біотехнології та біоінженерія»

Пилипчук Г.М.

Керівник: к.с.-г.наук, с.н.с., доцентка

кафедри біотехнології та радіології

Сварчевська О.З.

Рецензент: к.с.-г. наук, доцент кафедри

технології виробництва і переробки

продукції дрібних тварин Періг Д.П.

Робота заслухана на засіданні кафедри біотехнології та радіології і
рекомендована до захисту в ЕК, протокол №25 від 1.06.2023 р.

Завідувач кафедри біотехнології та радіології,

професор, доктор с.-г. наук




Бусяк В.І.

Львів – 2023

ЗАТВЕРДЖЕНО
Наказ Міністерства освіти і науки,
молоді та спорту України
29 березня 2012 року № 384
Форма № Н-9.01

Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С.З. Гжицького
Інститут, факультет, відділення факультет харчових технологій та біотехнології
Кафедра, циклова комісія кафедра біотехнології та радіології
Освітньо-кваліфікаційний рівень бакалавр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ
завідувач кафедри, голова циклової
комісії  Буцяк В.І.
“06” 02 2023 року

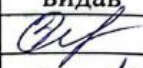

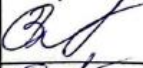





ЗАВДАННЯ НА БАКАЛАВРСЬКУ КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧУ

Пилипчук Ганні Миколаївні

1. Тема бакалаврської роботи “Використання макро- і мікроелементів у розріджувачах еякулятів з метою покращення фізіологічної якості сперми”. Керівник бакалаврської роботи Сварчевська Оксана Зіновіївна, к.с.-г.н., с.н.с. затверджені наказом вищого навчального закладу від 06.01.2023 року №31-4
2. Строк подання бакалаврської роботи 10.05.2023 року.
3. Вихідні дані до бакалаврської роботи.
Вихідні матеріали до виконання роботи: еякулят, середовище розрідження, анабіоз, цитрат, мікроелемент, лактозо-жовтково-гліцериновий розріджувач, окисні процеси, сукцинатдегідрогеназа, бугаї, сперма.
4. Зміст бакалаврської роботи (перелік питань, які потрібно розробити) вступ, огляд літератури, умови та методика проведення досліджень, результати досліджень, висновки, список використаної літератури.
5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень) графіки, діаграми, рисунки, технологічні схеми, технологічні лінії)
Рисунки: стандарт для визначення активності сукцинатдегідрогенази, Од; динаміка змін дихальної активності сперми за додавання до розріджувача цитратів купруму, цинку і мангану; динаміка змін відновлювальної здатності сперми за додавання до розріджувача еякулятів цитратів окремих мікроелементів.

Схеми: схема проведення експериментів.

6. Консультанти розділів бакалаврської роботи

Розділ	Консультант ПІБ, посада	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв
1. Літературний огляд	доц. Сварчевська О.З.		
2. Методика експерименту та основні методи досліджень	доц. Сварчевська О.З.		
3. Експериментальна частина	доц. Сварчевська О.З.		
4. Висновки	доц. Сварчевська О.З.		

7. Дата видачі завдання 06.02.2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

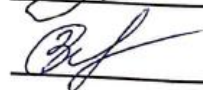
№ з/п	Назва етапів бакалаврської роботи	Термін виконання	Примітка
1.	Літературний огляд.		35%
	I атестація:	10.04.23р.	35%
2.	Методика експерименту та основні методи досліджень.		20%
3.	Експериментальна частина.		40%
	II атестація:	20.04.23р.	55%
4.	Висновки		5%
	III атестація:	2.05.23р.	10%
	Допущено до захисту.	10.05.23р.	100%

Здобувач



Пилипчук Г.М.

Керівник бакалаврської роботи



Сварчевська О.З.

ЗМІСТ

	стор.
АНОТАЦІЯ.....	4
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	9
1.1. Характеристика еякулятів.....	9
1.2. Вплив різних факторів на активність і життєздатність сперми.....	9
1.3. Анабіоз сперматозоїдів.....	12
1.4. Оцінка якості еякулятів тварин.....	12
1.5. Розбавлення, зберігання та транспортування сперми.....	15
1.5.1. Характеристика середовищ, які використовують для розрідження еякулятів.....	15
1.5.2. Методика приготування цитратних середовищ.....	19
1.5.3. Розбавлення, фасування, зберігання та транспортування біологічної рідини.....	21
1.6. Дослідження впливу наноцитратів металів на організм тварин.....	23
1.7. Підвищення якості еякулятів тварин за додавання у розріджувачі наноцитратів мікроелементів.....	27
РОЗДІЛ 2. УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	29
2.1. Оцінювання дихальної активності та відновлювальної здатності сперми..	31
2.2. Визначення активності сукцинатдегідрогенази (СДГ) у спермі бугаїв.....	31
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	34
3.1. Вивчення впливу добавок до розріджувача сперми окремих мікроелементів у формі цитратів на активність СДГ.....	34
3.2. Вплив добавок до розріджувача сперми цитратів мікроелементів на показники виживання сперматозоїдів.....	36

3.3. Вплив доданих до розріджувача сперми цитратів мікроелементів на її дихальну активність і відновлювальну здатність.....	37
ВИСНОВКИ.....	44
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	45

АНОТАЦІЯ

Загальна характеристика роботи. Дипломна робота складається з вступу, 3 розділів, висновків, списку використаної літератури. Вона містить 4 рисунки, 5 таблиць, 39 джерел використаної літератури. Загалом — 50 сторінок.

Ключові слова: еякулят, середовище розрідження, анабіоз, цитрат, мікроелемент, лактозо-жовтково-гліцериновий розріджувач, окисні процеси, сукцинатдегідрогеназа, бугаї, сперма.

Актуальність теми. Для покращення якості сперми бугаїв використовують різноманітні середовища розрідження. Оскільки мікроелементи беруть участь у регулюванні обмінних процесів у спермі, то їх внесення в розріджувач є обов'язковим.

Сьогодні активно досліджують цитрати мікроелементів, які є набагато ефективнішими, ніж їхні аналоги у вигляді солей. У цьому напрямку вчені вже досягли певних успіхів [14–17, 34, 36].

Для досліджу використано цитрати Zn (3,0; 0,6; 0,006), Cu (0,4; 0,04; 0,004) і Mn (1,0; 0,1; 0,01). Такі концентрації мікроелементів неоднозначно впливають на дихальну активність та споживання кисню сперматозоїдами. Активність СДГ змінюється неоднозначно в залежності від вмісту доданих цитратів мікроелементів. Цитрат купруму у високих дозах проявляє цитотоксичний вплив на метаболізм статевих клітин. Щоб нормалізувати окисні процеси та забезпечити тривале виживання сперматозоїдів у середовище розрідження краще додавати в 10–20 разів нижчі дози Cu-, Zn- і Mn-цитратів, порівняно до їх аналогів у вигляді неорганічних солей. Оптимальними концентраціями, за яких спостерігається покращення якості сперми бугаїв є такі: 0,004 мг/ л Cu-, 0,06 мг/ л Zn- і 0,01 мг/ л Mn-цитратів.

Мета роботи: дослідити вплив наноцитратів металів у різних концентраціях на якість сперматозоїдів бугаїв.

Для досягнення мети поставлено такі **завдання:**

- визначити вплив мікроелементів на окиснювальні процеси у сперматозоїдах;
- дослідити дію різних доз Mn-, Cu-, Zn-цитратів на якість сперми;
- визначити оптимальні концентрації цитратів мікроелементів, які здатні покращити якість еякулятів;
- дізнатися в яких кількостях цитрати Mn, Cu та Zn негативно впливають на обмінні процеси у спермі;
- визначити термін виживання сперматозоїдів за додавання у них нанометалів.

Об'єктом дослідження в даній роботі є розріджені еякуляти бугаїв.

Предметом дослідження є вплив цитратів мікроелементів Zn, Cu та Mn на якість сперми тварин.

Методи дослідження. Цитрати металів ми отримували методом аквананотехнології. У розрідженій спермі з додаванням Zn, Cu та Mn цитратів нами було досліджено: споживання кисню, відновлювальну здатність, активність сукцинатдегідрогенази та виживання сперматозоїдів (год.). Статистичний аналіз результатів проводився методом варіаційної статистики з t-критерієм Стюдента і η — кореляційного відношення за М. О. Плохінським. Дихальну активність сперми визначали полярографічно з використанням електрода Кларка, об'ємом 1,0 мл. Відновлювальну здатність — потенціометрично з використанням системи відкритих мікроелектродів. Дихальну активність сперми реєстрували потенціометром КСП–2. Дослідження інтенсивності дихання сперми проводили за температури 38,5°C у фосфатно-сольовому буфері. Активність сукцинатдегідрогенази визначали 2-,3-,5-трифенілтетразолієм хлористим, який під дією ензиму відновлювався до червоного формазану.

Практичне значення одержаних результатів. Результатами наших досліджень встановлено оптимальні концентрації цитратів мікроелементів, які можна додавати в розріджені еякуляти бугаїв. Також ми визначили токсичні дози нанометалів, які не варто вносити у розріджувач сперми.

Доведено, що для покращення якості сперми бугаїв необхідно в розіджувач еякулятів додавати наночитрати мікроелементів (Mn, Cu, Zn) у визначених оптимальних концентраціях.

ВСТУП

Сперматозоїди, які знаходяться поза організмом швидко гинуть. Причини загибелі різні: температурний перепад, зміна осмотичного тиску, інтоксикація продуктами життєдіяльності сперматозоїдів та інше [12]. Щоб захистити спермії від дії негативних факторів зовнішнього середовища і тим самим подовжити термін їхнього життя застосовують різноманітні розріджувачі.

Оскільки еякуляти тварин транспортують на далекі відстані, то після розрідження їх заморожують в рідкому азоті за температури -196°C [12, 13, 23]. Після розморожування спермії повинні виконувати свою головну функцію — запліднення. Тому середовища для розрідження повинні містити фосфоліпіди, електроліти, неелектроліти, кріопротектори, біологічно активні речовини та інші інгредієнти, що зумовлено багаточисельністю фізико-хімічних процесів, які проходять у сперміях за охолодження і глибокого заморожування [2].

Мікроелементи відіграють важливу роль у регулюванні обмінних процесів сперміїв. Їхнє застосування у вигляді солей в складі розріджувачів не ефективне, бо має ряд недоліків: нетривалий контакт із статевими клітинами після розрідження, низька проникливість через мембрани та здатність включатись у метаболізм, присутність інших складових сполук солей. Найкраще мікроелементи застосовувати у вигляді органічних форм металів, тобто цитратів [34].

В останні декілька років досить часто створюють середовища із застосуванням наночастинок металів. Їх розмір становить від 1 до 100 нм. І тому вони можуть вступати у прямий контакт з різними хімічними сполуками [2].

У літературних джерелах міститься інформація про те, що нанометали лише в певних концентраціях позитивно впливають на якість і запліднювальну здатність сперміїв. За збільшення доз цих наночастинок — знижується виживання сперматозоїдів [12, 14].

У зв'язку з цим, нами було проведено дослідження для вивчення впливу різних концентрацій цитратів металів, отриманих шляхом нанотехнологій, на еякуляти бугаїв.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Характеристика еякулятів

Сперма — це рідина, яка виділяється за еякуляції. Вона складається з сперматозоїдів та плазми [22].

Еякулят — це сперма, виділена твариною за один раз [13].

Біологічна рідина барана густа, однорідна, жовта, біла з жовтим відтінком або жовто-коричнева. У бугая — біла, біло-жовта, менш густа. Сперма жеребця та кнура сіро-біла, світло-сіра.

Довжина сперматозоїдів тварин — від 50 до 80 мкм. У бугая та барана спермії довжиною 75–80 мкм, у кнура — 50–55 мкм, у жеребця — 50–60 мкм [13].

Спермії на 75,4 % складаються з води та на 24,6 % з сухих речовин (білків, ліпідів і мінеральних речовин) [12, 13].

Біологічна рідина бика і барана містить цукри (здебільшого фруктозу), лимонну кислоту, вільні амінокислоти, сорбітол та інозитол [23].

Сперма багата на вітаміни, ензими, гормони, простогландини та інше [12, 23].

Сперматозоїди — факультативні анаероби. Вони отримують енергію під час дихання (90 %). Якщо в середовищі нема кисню, то джерелом енергії стає цукор (фруктоза, глюкоза), який засвоюється за допомогою гліколізу та фруктолізу [23].

1.2. Вплив різних факторів на активність і життєздатність сперми

Сперматозоїди, які знаходяться поза організмом гинуть, тому що відбувається:

- виснаження джерел енергії;

- інтоксикація речовинами, що виділяють спермії в процесі життєдіяльності;
- руйнування покриву та набухання сперматозоїдів;
- негативний вплив мікроорганізмів, які розвиваються у сперміях;
- зміна температури [12, 13];
- збільшення кількості лактату [12].

Під час еякуляції до вмісту епідідімісу домішуються секрети додаткових статевих залоз. Вони змінюють рН середовища, насичують плазму електролітами, які руйнують ліпопротеїдний покрив сперміїв. Через це сперматозоїди переходять зі стану анабіозу в активний стан і тому швидко гинуть [13, 23].

Сонячні промені позитивно впливають на рух сперміїв, але не надовго (через 20–40 хв. статеві клітини гинуть). Тому із спермою працюють лише в закритих приміщеннях. При роботі зі сперматозоїдами використовують простий скляний посуд або ж з оранжевого скла (затримує УФ-промені). У лабораторії та інших приміщеннях, в яких працюють зі спермою на вікнах повинні бути марлеві або поліетиленові штори. У приміщеннях використовують також матове скло, яке вставляють у вікна та матові електролампи [12, 13, 23].

Температура. За температури 38–40°C сперматозоїди стають дуже активними, але при цьому пришвидшуються обмінні процеси і відбувається накопичення продуктів обміну у сперміях, що призводить до їх загибелі. За температури 43–45°C підвищується активність сперматозоїдів. Спермії втрачають здатність до запліднення за 47°C, за 50°C вони гинуть [12]. За зниження температури рухливість статевих клітин сповільнюється. За температури 0°C вони впадають в анабіоз (гальмуються обмінні процеси, збільшується виживаність статевих клітин). За раптового охолодження сперми настає холодний удар (температурний шок) [13].

Осмотичний тиск. Через збільшення кількості продуктів обміну речовин змінюється осмотичний тиск сперми, який впливає на термін життя сперматозоїдів. Найкраще вони виживають у середовищах, де осмотичний тиск

зрівноважується з тиском розчинених у них речовин. Швидкі зміни тиску негативно впливають на статеві клітини тварин [13].

Поступова зміна середовища дає можливість сперматозоїдам пристосуватися до нових умов [12].

pH середовища. Свіжа сперма биків і баранів має рН-реакцію 6,7–7,0, біологічна рідина кнурів та жеребців — 7,2–7,6 [23]. У кислому середовищі рухливість сперматозоїдів гальмується або вони гинуть, а в лужному — активується [13, 23].

Спермії чутливі до ***хімічних речовин*** — скипидару, формаліну, нашатирного спирту, марганцевокислого калію, креолу, лізолу, лугів, сулеми, нікотину, окисів купруму та ін. [13, 23]. Навіть мінімальні дози чи запах цих речовин є отруйними для еякулятів тварин. Заборонено зберігати такі речовини у приміщеннях, де знаходиться сперма. Інструменти, які застосовують при роботі з еякулятами є скляними, а металеві — нікельованими. Процеси миття та стерилізації проводять в резервуарах, виготовлених з неокиснюваних металів або з антикорозійним покриттям. Токсичними для сперматозоїдів є окремі сорти гуми, гумові камери, дистильована вода, вазелін та інше [13].

Органічні кислоти (бурштинова, молочна та інші) проникають крізь оболонку сперматозоїда і розкладаються на йони, підкислюючи середовище та гальмуючи обмін речовин, навіть у малих кількостях.

Неорганічні кислоти (сульфатна, фосфатна та інші) дисоціюють на вільні йони, які не проникають крізь оболонку сперміїв, тому не впливають на їх рухливість [13, 23].

Вплив мікробного та грибового забруднення. Одержана від тварин сперма може бути забруднена мікроорганізмами. У біологічній рідині визначають загальну мікробну контамінацію — кількість мікробних клітин в 1 мл свіжоодержаної сперми. За цим показником визначають 5 ступенів чистоти сперматозоїдів:

- стерильна;
- незначно забруднена — до 1000 мікробів;

- слабо забруднена — 2000 мікробів;
- середньо забруднена — до 5000 мікробів;
- сильно забруднена — більше 5000 мікробів.

Ветеринарно-санітарними вимогами допускаються еякуляти тварин 4-х ступенів чистоти [13].

1.3. Анабіоз спермійв

Анабіоз — це нерухомий стан сперматозоїдів, за якого зберігається їхня життєздатність.

Після отримання еякуляту, його одразу вводять у стан анабіозу. Таким чином заощаджуються енергетичні ресурси спермійв і гальмується утворення продуктів метаболізму. Тобто сперматозоїди живуть довше [13, 23].

Явище анабіозу дуже поширене в штучному заплідненні. Існують такі методи введення спермійв у стан анабіозу:

- зниження температури до 2–4°C;
- замороження сперми за температури -196°C;
- зниження рівня рН до 6,3–6,4 за допомогою органічних кислот;
- використання хімічних інгібіторів для гальмування різних процесів метаболізму в сперматозоїдах [12, 13, 23].

Різні автори вказують на те, що у стані штучного анабіозу за температури -196°C еякуляти можна зберігати багато років, а їхня рухливість буде відновлюватися одразу ж після розмороження [2, 12, 13, 23].

1.4. Оцінка якості еякулятів тварин

Мета дослідження:

- оцінити плодючість тварин та їх придатність до осіменіння;
- дослідити фізіологічний стан тварин та методи відбирання в них еякуляту;

– оцінити якість сперматозоїдів і визначити правильний ступінь розбавлення еякуляту [12].

Спочатку еякулят оцінюють за зовнішнім виглядом: колір, запах, консистенція, об'єм та інше.

Колір сперми є різним. Наприклад, у бугая сперма біла або білувато-жовтувата, у барана — жовта. Сперма не має запаху, однак у барана може пахнути жиропотом, а в бика — молоком. Запах біологічної рідини встановлюють при виливанні еякуляту із спермо приймача або порухом руки [13].

Об'єм сперми визначають таким чином:

1. У барана: додають в еякулят 1 мл розріджуючого середовища за температури 36–38°C. Потім із спермо приймача піпеткою відбирають еякулят або переливають його по стінці в градуйовану мензурку.

2. У бика: зважують одноразовий спермоприймач на спеціальних вагах (1 г = 1 мл).

3. У жеребця і кнура: з градуйованого спермоприймача переливають у циліндр, фільтрують крізь 4 шари чистої марлі; зважують поліетиленовий сім'янозбірник на вагах.

Методи мікроскопічної оцінки якості.

Концентрація. Для цього використовують спеціальні рахувальні камери. Як альтернативу можна використовувати такі методи визначення концентрації: фотоелектроколориметричні, за ступенем мутності та інші.

Оцінка активності спермів. Тут застосовують метод роздавленої краплі за збільшення в 120–280 разів і температури 38–40°C, розбавивши сперму 2,9%-вим розчином цитрату натрію. Потім як мінімум у 3-х полях зору підряд вираховують по 10 сперміїв і кількість сперматозоїдів з прямолінійно-поступальним рухом. Оцінюють у балах [12].

Оцінка за густиною. Свіжа сперма має певні оцінки:

– густа (Г) — все поле зору мікроскопа суцільно заповнене сперміями. У густій спермі міститься понад 1 млрд. сперматозоїдів у 1 мл;

– середня (С) — між сперміями добре помітні проміжки, але їх розміри менші за довжину сперміїв. Тут міститься від 400 млн. до 1 млрд. сперматозоїдів у 1 мл;

– рідка (Р) — у полі зору мікроскопа проміжки між сперміями більші за довжину одного спермія. В 1 мл еякуляту — менше 400 млн. сперматозоїдів.

Якщо в полі зору мікроскопа не видно сперматозоїдів, то це явище називають аспермією (А), якщо видно всього декілька — олігоспермією [13, 23].

Визначення відсотка живих і мертвих сперматозоїдів. Еякуляти змішують з барвниками — 5%-вим водним розчином еозину за В. А. Морозовим або еозин-нігрозиною фарбою за В. Я. Яблонським. В кінцевому результаті мертві спермії зафарбовуються, а живі — не зафарбовуються [13].

Визначення кількості дефектних сперматозоїдів. Сперму розбавляють цитратом натрію, роблять мазок, зафарбовують його фуксином або еозином, а потім підраховують у ньому патологічні сперматозоїди. Мазок підсушують і розглядають під мікроскопом (збільшення в 600 разів). Підраховують 500 сперматозоїдів. Допускається використання сперми з дефектами не більше 18 % у бика, 14 % — у барана, 20 % — у кнура і 25 % — у жеребця.

Біологічна оцінка якості.

1. Час знебарвлення метиленового синього. Краплю еякуляту швидко змішують з краплею 0,01 % метиленової синьки на фізіологічному розчині. Набирають у скляну трубочку ($d = 0,8-1,0$ мм) і кладуть на білому фоні та визначають час знебарвлення.

Сперма за якістю поділяється на: хорошу (знебарвлюється за декілька хвилин), середню і погану. Чим швидше знебарвлюється сперма, тим кращою вона є для осіменіння самок.

2. Абсолютний показник виживаності сперміїв. Після розбавлення 1–2 мл сперми, її зберігають за чітко встановленою температурою і щодня визначають активність сперміїв за 38–40°C до повної їх загибелі. Отримані результати сумують (у годинах) і одержують абсолютний показник виживання. Для

еякуляту барана він має бути не менше 1600, бика — 1000–1400, жеребця — 400–730, кнура — 700–800.

3. Визначення резистентності спермійв. Визначають стійкість статевих клітин до розведення 1%-вим розчином хлористого натрію (розчиняє ліпопротеїдну оболонку). Виражається кількістю мілілітрів розчину, доданого до 1 мл одержаної сперми до припинення прямолінійно-поступального руху спермійв. Показники резистентності: у барана та бика — від 5000 до 50000 і вище, у кнура — від 2000 до 3000, у жеребця — від 500 до 1500 [12].

1.5. Розбавлення, зберігання та транспортування сперми

1.5.1. Характеристика середовищ, які використовують для розрідження еякулятів

У зовнішньому середовищі сперматозоїди швидко гинуть і тому, щоб цього не сталося треба:

- ввести спермії в стан анабіозу;
- додати всі необхідні речовини, які зможуть забезпечити статеві клітини енергією;
- зміцнити мембрани сперматозоїдів;
- запобігти утворенню отруйних речовин;
- пригнічувати утворення мікроорганізмів;
- захистити статеві клітини від температурних перепадів і кріогенного впливу [13].

Сперматозоїди житимуть довше якщо їх розвести спеціальними розріджувачами (виконують захисну функцію). Розбавлення еякуляту полегшує його ділення на порції (спермодози), збільшує об'єм біологічної рідини, що дозволяє запліднити більшу кількість самок [12, 13, 23].

Вимоги до розріджувачів:

- вони повинні збільшувати об'єм сперми;

- інгібувати обмінні процеси в статевих клітинах;
- бути ізотонічними і підтримувати осмотичний тиск на однаковому рівні впродовж всього часу зберігання біологічної рідини;
- бути буферами, тобто запобігати зміні рН;
- забезпечувати сперматозоїди енергією як в аеробних, так і в анаеробних умовах;
- зрівнювати співвідношення кількості електролітів і неелектролітів;
- захищати спермії від температурного шоку (жовток курячого яйця);
- захищати еякуляти від руйнування в процесі замороження-розмороження;
- повинні вбивати бактерії (пеніцилін, стрептоміцин, препарат «Спермосан-3» тощо);
- покращувати якість запліднення (гіалуронідаза, простогландин F2a, рилізінг-гормон) [13].

Види середовищ

Існують біологічні та синтетичні середовища розрідження. Для створення біологічних середовищ раніше часто використовували коров'яче та кокосове молоко, 7%-вий розчин бджолиного меду і томатний сік.

На даний час популярності набули синтетичні розріджувачі. Вони складаються з трьох і більше компонентів [12].

Середовища з добре підібраними складниками краще інгібують окисні процеси в еякулятах і глюкоза, яка присутня в середовищі, менше витрачається на енергетичні потреби сперматозоїдів. Тобто повільно окислюється середовище та подовжується термін зберігання сперміїв [15].

Компоненти розріджувачів:

Цукри (глюкоза, лактоза). Це джерела енергії для сперматозоїдів. Вони сприяють підтриманню осмотичного тиску на однаковому рівні, знижують електропровідність середовища, захищають еякуляти від втрати електричного заряду.

Цитрат натрію. Буфер середовища, інгібує утворення отруйних продуктів життєдіяльності статевих клітин.

Трис-буфер (2-аміно-2-гідрометил-1,3). Тримає рН середовища та осмотичний тиск на однаковому рівні, захищає спермії від дихального ацидозу.

Трилон Б (хелатон, двонатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти). Зв'язується з йонами Са і гальмує дію протеаз, АТФаз та інших ензимів метаболізму.

ЕДТА (тринатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти). Схожа за дією з трилоном Б, інгібує активність ензимів і створює хелатні комплекси з Ca^{2+} .

Амонію сульфат $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$. Прозорий кристалічний порошок з жовтим відтінком. Захищає сульфгідрильні групи сперміїв від руйнування, перешкоджає зникненню електролітів.

Гліцерин. Кріопротекторна речовина, яка швидко проникає через мембрани сперматозоїдів, знижує температуру заморожування та перешкоджає утворенню кристалів води. Гліцерин є гідрофільним і саме тому запобігає виходу води з цитоплазми. Він попереджає зростання осмотичного тиску під час замороження.

Жовток курячого яйця. Містить лецитин і ліпопротеїди. Лецитин створює адсорбційний шар, тобто захищає статеві клітини від температурного шоку. Також жовток містить поживні та біологічно активні речовини (амінокислоти, жири- і водорозчинні вітаміни тощо).

Антибіотики також входять до складу розріджувачів. Бактеріостатичні речовини — стрептоміцин, стрептоцид, пеніцилін, гентаміцин, тилозин, лінкоміцин, спектиноміцин або комбіновані препарати (спермосан-3, спермосан ППК, комбіспермосан ЛАП та інші).

Спермосан ППК. Антибактеріальний препарат, що містить пеніцилін, поліміксин, канаміцин. Цей препарат найкраще запобігає розмноженню мікроорганізмів у сперміях. Існує також ряд інших потужних препаратів:

комбіспермосан, що складається з левоміцетину, ампіциліну і поліміксину; ГАМП (гентаміцин+ампіцилін) та інші [12, 13, 23].

Всі інгредієнти середовищ поділяють на термостійкі (вуглеводи) і нетермостійкі (курйчий жовток, гліцерин, антибіотики та інше). Компоненти, які витримують дію високих температур додають у воду першими, добре перемішують, ставлять на водяну баню і кип'ятять 5–10 хвилин. Готову суміш охолоджують, а потім додають нетермостійкі інгредієнти.

Синтетичні середовища готують у лабораторії з окремих компонентів або використовують їх у вигляді порошку, який пізніше розводять водою та кип'ятять [12].

Для розрідження використовують такі поживні середовища:

1. ЛЖГ — лактозо-жовтково-гліцеринове — застосовується для розрідження сперми биків, яку потім заморожують у гранулах;
2. ЛФРМГЖ — лактозо-фруктозо-рафінозо-магнієво-гліцерино-жовткове використовується для розрідження еякулятів биків, які пізніше заморожують в паєтах;
3. ГХЦС — глюкозо-хелато-цитратно-сульфатне — для розрідження біологічної рідини кнурів;
4. ЛХЦЖ — лактозо-хелато-цитратно-жовткове — для сперми жеребців;
5. ГЦЖ — глюкозо-цитратно-жовткове — для розрідження та зберігання еякулятів баранів [13, 23].

На сьогоднішній день створення середовищ на основі наноцитратів металів стало досить перспективним для штучного запліднення. Найпоширенішими нанометалами тепер є: цинк, купрум, ферум, аргентум, манган та їх оксиди, розміром від 5 до 60 нм.

Наночастинки дуже маленькі, їх розмір складає від 1 до 100 нм. Через це вони можуть швидко зв'язатися з різними хімічними сполуками і структурними компонентами клітин (ліпіди, нуклеїнові кислоти та інше).

Є два методи отримання наноматеріалів: фізичні (подрібнення речовин до маленьких частинок) і хімічні (відновлення йонів металів до атомів) [2].

Санітарно-гігієнічні вимоги до середовищ:

- застосовувати тільки стерильний скляний посуд;
- готувати синтетичне середовище перед розведенням потрібно максимум за 3 год. до його використання;
- сперму розріджувати треба одразу після отримання (до 10 хв. від часу одержання);
- температура розріджувача і сперми має бути однаковою;
- для приготування середовища потрібно брати тільки дистильовану воду;
- під час розрідження середовище до еякуляту потрібно вливати тонким струменем;
- компоненти розріджувачів завжди треба точно відважувати на аналітичних вагах [2, 13, 23].

1.5.2. Методи приготування цитратних середовищ

Глюкозо-хелатно-цитратно-сульфатне середовище (готують для розрідження сперми кнурів)

100 мл дистильованої води вливають у колбу, додають туди 4 г глюкози і закривають паперовим ковпаком. Потім суміш переносять на електроплиту та кип'ятять 1–2 хв. Після цього колбу з рідиною залишають остигати до 80°C, тоді всипають 3,8 г цитрату натрію, 0,5 г соди, а коли середовище охолоне до температури 55–58°C додають 2,6 г хелатону. До охолодженої рідини (40–45°C) додають 25–30 ОД спермосану.

Глюкозо-жовтково-цитратне середовище (готують для розрідження сперми бугаїв)

Беруть аптечні терези та зрівноважують їх, потім кладуть на них паперові фільтри і знову зрівноважують. У велику колбу вливають 3 л бідистильованої

води і накривають її ковпаком (паперовим або поліетиленовим). Воду в колбі переносять на електроплиту і доводять до кипіння, потім залишають її остигати до 35°C.

На ліву шальку ваг пінцетом кладуть 3-грамову гирю, чистою ложкою накладають на праву шальку (встелену паперовим фільтром) ваг у певній кількості глюкозу. Потім глюкозу висипають у чисту колбу на 100 мл і позначають це на колбі.

Фільтрувальний папір ще раз кладуть на ваги і відважують 1,4 г цитрату натрію та 120 мл стрептоциду. Стрептоцид і цитрат натрію всипають у колбу з глюкозою. Після цього беруть пеніцилін, відкривають його, зважують на вагах та визначають у якій масі речовини міститься 75–100 тис. ОД. Відважують цю кількість і всипають у колбу. Таким же чином у колбу з сумішшю вносять 75–100 тис. ОД стрептоміцину.

Буває таке, що важко відважити потрібну кількість антибіотиків. Тому в пляшечку з антибіотиком вливають 4 мл кип'яченої та охолодженої (20°C) дистильованої води. Коли препарат повністю розчинився, то від нього відбирають потрібну кількість і вливають у колбу з розріджувачем, який готується. Якщо розріджувача готують дуже багато, то знаходять такі пляшечки антибіотиків, які містять потрібну їх кількість.

100 мл кип'яченої та остиглої до 35°C дистильованої води виливають у колбу з відваженими речовинами і розмішують скляною паличкою до повного розчинення реактивів. Потім цю суміш фільтрують через паперовий фільтр.

Далі знадобиться куряче яйце. Його миють щіткою, сушать (протирають серветкою), шкаралупу протирають тампоном, змоченим 70%-вим спиртом (або тримають його 10–15 хв. у бактерицидній камері під УФ-випромінюванням. Після цього стерильним скальпелем або пінцетом розколюють шкаралупу яйця надвоє, переливаючи жовток з однієї половинки шкаралупи в іншу. Цю дію виконують над стерильною чашкою, відокремлюючи жовток від білка.

Отриманий жовток кладуть на фільтрувальний папір і перекочують його по паперу. Папір складають вдвічі, при цьому трохи стискають жовток,

проколюють скальпелем його оболонку і виливають в мензурку. Залишки жовтка витісняють, здавлюючи фільтр ззовні.

12 мл жовтка вливають у колбу з розчищеною сумішшю, розмішують, накривають серветкою та кладуть у термостат або каструлю з теплою водою (25–35°C) [13].

1.5.3. Розбавлення, фасування, зберігання та транспортування біологічної рідини

В одній дозі свіжої сперми перед розрідженням повинно бути 37,5 млн. сперматозоїдів з прямолінійно-поступальним рухом, а після розмороження — 10–15 млн. з активністю в 4 бали [12, 13].

Для розрідження використовуються еякуляти бугаїв з активністю у 8 балів і концентрацією 800 млн. сперматозоїдів у 1 мл сперми. У барана піддають розрідженню лише густу сперму, з активністю сперміїв у 9 балів. Еякуляти кнурів розріджують за рухливості сперматозоїдів, оціненої у 8 балів і концентрації 100 млн. сперміїв, а жеребців — 6 балів і з концентрацією 150 млн. [13].

Розріджену сперму розфасовують:

1. У пайстах. Температура середовища та сперми перед початком процесу розрідження повинна бути однаковою ($27 \pm 1^\circ\text{C}$). Спочатку середовище вливають до еякуляту в співвідношенні 1:1, а через 15 хвилин за температури 18–20°C виливають решту розріджувача. Після цього перевіряють активність сперматозоїдів і проводять другий етап розведення сперми.

Після розрідження еякуляти розливають у пайети. Переважно використовують 2 технології розфасування спермодоз:

- литовську: 0,25 мл сперми розфасовують у поліпропіленові соломинки і закривають скляними кульками;
- французьку: еякуляти фасують по 0,3 мл, пайета запаюється з одного боку, а з другого вона закривається пижом.

2. У гранулах. Сперму розріджують за температури $31 \pm 1^\circ\text{C}$. Розведені еякуляти еквілібрують за температури $2-5^\circ\text{C}$ 4 години і розфасовують на охолоджених до $-160-170^\circ\text{C}$ фторопластових пластинах. Потім цю пластину з еякулятом тримають 1–2 хвилини над рідким азотом, збирають у гранули, кладуть у марлеві мішечки і зберігають у стаціонарному сховищі [12].

Зберігають еякуляти тільки хорошої якості коротко- або довготерміновим способом:

- короткотерміновим зберіганням, температура $2-5^\circ\text{C}$ (бугаїв — до 72 год., баранів — до 24 год., жеребців — до 48 год.);
- короткотерміновим, $16-20^\circ\text{C}$ (кнурів — до 72 год.);
- тривалим — у рідкому азоті за температури -196°C [12, 13].

Найкраще заморожувати сперму рідким азотом. Такий спосіб охолодження біологічної рідини має переваги: довготривале зберігання (декілька років) та перевезення на далекі відстані [13].

Для перевезення еякулятів використовують посудини Дьюара (5–20 літрів), падіння і пошкодження яких не допускається. До кожної партії еякуляту додають ордер з датою і годиною одержання сперми, кличкою плідника, дозою та оцінкою сперміїв [12, 13].

Вимоги до транспортування:

- а) не допускати стрясання та збовтування еякулятів;
- б) в посудинах для перевезення температура завжди має бути однаковою (близько 0 ; -196°C);
- в) не пошкоджувати і не перекидати термоси, ємності або посудини;
- г) правильно підписувати ємності зі спермою, вказуючи номер та ім'я плідника, дату одержання еякуляту, а також додавати ордери, у яких правильно написана адреса отримувача, номер посудини й плідника;
- г) еякуляти тварин привозити в термін і в кількостях, вказаних у договорі, укладеному між станцією та господарством;
- д) захищати спермодози від дії сонячних променів, пилу та інших чинників зовнішнього середовища [13].

1.6. Дослідження впливу наноцитратів металів на організм тварин

Вченими вивчено вплив цитрату ванадію на активність ензимів глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-ФДГ) та лактатдегідрогенази (ЛДГ) в еритроцитах самок і самців щурів. Ця комплексна сполука впливала на онтогенез тварин, особливо на репродуктивну систему самців. Результати досліджень показали, що за споживання цитрату ванадію у самок активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази знизилася, а у самців — збільшилася. Активність ЛДГ у клітинах крові зростала як у самок, так і в самців. Тобто, сполуки ванадію краще впливали на особин чоловічої статі [8].

Група дослідників з'ясувала дію різних концентрацій наноцитратів на організм великої рогатої худоби, свиней, кролів і бджіл. Ученими отримано чисті та безпечні метали методом нанобіотехнологій.

Зокрема виявлено, що цитрати кобальту, цинку, селену та хрому позитивно впливали на корів. У них покращилися функції печінки, обмін Р, Са та вітаміну Е, активувалися обмінні процеси в організмі, підвищилася кількість надоїв молока.

Додавання цитратів мангану, цинку і купруму до розріджувачів сперми кнурів і биків сприяло покращенню запліднювальності тварин.

Нанометали позитивно впливали на поросят, яких відлучили від матерів: зросла кількість та антиоксидантна активність клітин крові; підвищився рівень гемоглобіну, а також покращився імунітет тварин (вони стали стійкішими до захворювань); збільшилася маса тіла.

Згодовування свиноматкам цитрату хрому за декілька днів до народження поросят стимулювало еритропоетичну функцію у матерів і потомства. Також, у свиноматок зростала активність лейкоцитів і кількість лімфоцитів у крові. У вагітних свиноматок та кролиць наноцитрат хрому покращував обмін речовин, а також нормалізував антиоксидантну та імунну системи організму.

Цитрати металів позитивно впливали на організм бджіл: підвищувалась їх життєздатність, збільшувалась кількість в організмі мікроелементів, ліпідів і вуглеводів [1].

Проводилися дослідження на потомстві щурів F2 щодо впливу на організм і сенсорно-рухові рефлекси різних доз цитрату германію. Формування рефлексів і розвиток нервової системи оцінювали за допомогою фізіологічних тестів.

Як відомо, Ge впливає на важливі фізіологічні функції тварин. Він дуже потрібен під час росту і розвитку організму, бо формує імунний захист.

Тварини, яким випоювали германій, володіли точною координацією рухів і в них швидше формувалися сенсорно-рухові рефлекси. За дози 10 мкг Ge / кг маси тіла підвищувалась горизонтальна рухова та дослідницька активність щурів. За дози 20 мкг Ge / кг і 200 мкг Ge / кг маси тіла збільшувалась пристінкова та вільна стійка [28].

Згодом група вчених досліджувала вплив цитрату германію у дозах 20 і 200 мкг Ge/кг маси тіла на організм самців щурів F3. Тривале випоювання Ge у період статевого дозрівання призвело до змін у червоній та білій крові тварин, доза в 20 мкг Ge/кг маси тіла сприяла збільшенню рівня гемоглобіну і зменшенню об'єму еритроцитів у крові. У тварин, які споживали 200 мкг Ge/кг маси тіла, спостерігали зниження сегментоядерних нейтрофілів [29].

Проводилися дослідження щодо впливу різних доз цитратів Se, I, S на організм кролів. За випоювання цих сполук спостерігалось збільшення кількості еритроцитів, лейкоцитів, концентрації гемоглобіну, загального протеїну, активності АлАт, лужної фосфатази, альбуміну і відносної кількості фагоцитарної та лізоцимної активності сироватки крові. Найефективніше на організм кролів впливали такі дози цитрату йоду: 10,0 і 20,0 мкг I / л води [21].

Вивчався вплив хлориду хрому та цитрату хрому на фізіолого-біохімічні процеси в організмі щурів. Науковці виявили, що зниження рівня глюкози в крові тварин та підвищення вмісту глікогену в печінці відбувалося за дії обох речовин. Проте, інтенсивніше функціонування антиоксидантної системи та

збільшення вмісту глікогену в м'язах тварин спостерігалось лише за дії цитрату хрому [7].

Встановлено позитивний вплив хлориду і цитрату хрому, суспензії хлорели, сульфату натрію на організм кролів. За дії вказаних біологічно активних речовин підвищувалась кількість еритроцитів, вміст гемоглобіну і білку в крові. Також у крові зменшувався вміст холестеролу, підвищувався рівень феруму і альбуміну [20].

Вченими досліджено фізіолого-біохімічні процеси організму кролів за впоювання цитрату силіцію та метасилікату натрію. Споживання тваринами органічного силіцію сприяло збільшенню кількості протеїну в крові. Сполуки Si позитивно впливали на білковий обмін і масу тіла кролів [6].

Вивчено вплив цитратів Co та Ni на вміст ліпідів і жирних кислот у тканинах бджіл. Доведено, що Ni та Co підвищують вміст ліпідів у організмі. За окремого згодовування цитратів мікроелементів збільшувався вміст жирних кислот [24].

Досліджено репродуктивну здатність бджолиних маток за впоювання цитратів Ag і Cu. Ці речовини підвищили інтенсивність відкладання яєць матками. Оптимальними дозами цитратів Cu і Ag є, відповідно, 0,5 та 1 мг/ 1000 мл сиропу [4].

Вченими досліджено антиоксидантний профіль корів та якість їхнього молока за внесення до комбікорму тварин наноаквагідрату йоду і цитратів Cr, Co, Zn та Se. Експериментально доведено, що ці речовини збільшують вміст у крові тварин фосфору, зменшують концентрацію малонового діальдегіду та підвищують кількість надоїв молока.

За згодовування коровам аквагідрату йоду і цитратів Se і Cr дослідники спостерігали збільшення вмісту вітаміну A в крові, зниження ТБК-позитивних продуктів, підвищення кількості жиру в молоці та зростання добових надоїв молока [31].

Досліджено вміст ліпідів у організмі бджіл за споживання Cu і Ag у літньо-осінній період. Зміна вмісту ліпідів у тканинах та різних відділах

організму бджіл відбувалася за споживання 0,5 і 1,0 мг аргентуму та купруму. Спостерігалось збільшення концентрації фосфоліпідів, моноацилгліцеринів, диацилгліцеринів і триацилгліцеринів у тканинах досліджуваних комах. Однак, при цьому знижувався вміст неестерифікованих жирних кислот і холестерину [3].

Група вчених досліджувала вплив цитрату нікелю, отриманого методом нанотехнології на організм корів. Згодовування нікелю в кількості 0,1 мг / кг сприяло зниженню активності АсАТ і підвищенню концентрації альбуміну в крові [32].

Досліджено вплив цитрату Ge на організм самок щурів та їхнє потомство. Вченими виявлено позитивний вплив нанометалу на лактаційну функцію самиць та їх приплід (збільшення маси тіла, 100%-ва виживаність). У тварин, які щодня випивали 200 і 300 мкг Ge / л, спостерігали збільшення кількості еритроцитів, лейкоцитів та концентрації гемоглобіну в крові, зменшення аланінамінотрансферазної та підвищення аспартатамінотрансферазної активності, збільшення вмісту протеїну. Також виявлено зниження кількості малонового діальдегіду і гідроперекисів ліпідів у клітинах крові тварин. Найкращий вплив на організм щурів мав наноцитрат Ge у кількості 200 мкг / л [5].

Вивчено вплив нанометалів селену, хрому і германію на вміст важких металів у тканинах бджіл. Вченими виявлено, що випоювання Cr у концентраціях 0,7 та 1,4 мг на 500 мл сиропу сприяло зниженню рівня Pb у тканинах комах, а згодовування цитрату Ge призвело до зменшення кількості Cd і Pb [30].

Проведено дослідження щодо впливу цитрату германію на мінеральний склад (Ni, Pd і Cd) у різних відділах тканин бджіл. Загалом в організмі комах за випоювання Ge спостерігалася низька концентрація кадмію. У тканинах голови виявили нижчий рівень нікелю та вищий — кадмію, порівняно з контрольною групою комах. У грудному відділі спостерігали вищу концентрацію плюмбуму, а в черевному відділі — нижчий рівень Ni, Pb і Cd [10].

Вченими досліджено вплив цитратів Cr і Zn на NO-синтазну активність клітин крові щурів із експериментально індукованим цукровим діабетом. Загалом нанометали позитивно впливали на організм тварин, бо дослідники спостерігали процес нормування NO-активності в еритроцитах, зменшення кількості глюкози та глікозильованого гемоглобіну в крові [26].

Вивчено дію цитрату магнію на життєздатність бджіл. Учені спостерігали як Mg у різних кількостях підвищував виживаність комах, але тільки в перші доби після випоювання. Цей мікроелемент дійсно позитивно діє на бджіл, однак він ще потребує додаткових досліджень щодо впливу різних його доз на виживаність комах [9].

Проведено дослідження щодо дії цитратів Co і Ge на бджолині матки. Доведено, що ці мікроелементи збільшують кількість яйцекладок маток як за окремого, так і за спільного їх випоювання [11].

1.7. Підвищення якості еякулятів тварин за додавання у розріджувачі наноцитратів мікроелементів

Проводилися дослідження якості кріоконсервованої сперми 25–40-річної давності бугаїв лебединської породи. Вчені провели два досліді. У першому досліджували сперму за терміном зберігання (до 35 років і більше 35). У другому — сперму тварин за кровністю: чистопородні та умовно кровні. Результати досліджень показали, що середня кількість сперматозоїдів у еякулятах тривалого зберігання становила 1478 млн., 52% сперміїв були рухливими. Загалом оцінена сперма була придатна для запліднення. Дослідники виявили зміни деяких показників якості сперматозоїдів. Найбільший вміст активних сперміїв був у спермо дозах бугаїв з умовною кровністю менше 75%. Найбільше нерухомих сперміїв (близько 30 %) було в еякулятах, які зберігалися до 35 років [19].

Вивчено вплив цитратів мікроелементів на виживання та інтенсивність окисних процесів у сперміях кнурів. Сперму розріджували фосфатно-сольовим

буфером. Встановлено, що будь-який вплив цитратів на сперматозоїди тварин залежить від їх дози. Якщо в середовище розбавлення додати більшу кількість органічної форми мікроелементів, то це призведе до зниження дихальної активності сперміїв та зміни активності сукцинатдегідрогенази [17].

Вивчено вплив наносукцинатів Mn, Cu та Zn разом із середовищем «Екосперм» на якість сперміїв кнурів. Встановлено, що дихальна активність сперми залежить від дози сукцинатів мікроелементів. Також вказано, що збільшення доз наносукцинатів не бажане, бо це погано впливає на дихання сперматозоїдів і активність сукцинатдегідрогенази [16].

Виявлено позитивний вплив Cu^{2+} , Zn^{2+} та Mn^{2+} сукцинатів на якість сперматозоїдів баранів. Науковцями встановлено, що додавання до сперми 0,4 мг / л Cu^{2+} подовжує її життєздатність. Активність ензимів за додавання наносполук у розбавлені еякуляти залежить від мікроелементу і статевих клітин. Не варто додавати великі дози сукцинатів, бо це знижує споживання O_2 сперміями [34].

Досліджено виживання сперматозоїдів кнурів за впливу різних доз цитратів та сукцинатів Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} . Як розріджувач було використано ЛЖС. Науковцями виявлено оптимальні дози, які підвищують виживання сперміїв упродовж 70,5–73,5 годин. Збільшувати дози цитратів і сукцинатів мікроелементів не варто, бо таким чином знижується виживання сперматозоїдів [14].

РОЗДІЛ 2. УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводили в Інституті біології тварин НААН і на Львівському НВЦ «Західплемресурси». Еякуляти бугаїв отримували на штучну вагіну з режимом використання плідників дуплетна садка два рази на тиждень. Для досліджень відбирали еякуляти, які відповідали наступним вимогам: об'єм– 2-6 мл, концентрація сперматозоїдів – $0,6-1,5 \times 10^9$ клітин/мл і активність– 7,5-8,0 балів.

У зв'язку з поставленою метою, розріджену лактозо-жовтково-гліцеринним розріджувачем (ЛЖГР) сперму ділили на частини та формували контрольну – без додавання та дослідні групи – з додаванням мікроелементів (МЕ) у формі органічних сполук – цитратів: Zn – 0,06, 0,6 та 3,0; Cu – 0,004, 0,04 і 0,4; Mn – 0,01, 0,1 і 1,0 мг/л (рис. 2.1). Синтез сполук металів з лимонною кислотою здійснено з використанням аквананотехнологій та отримані речовини люб'язно надані для проведення досліджень Українським державним науково-дослідним інститутом нанотехнологій і ресурсозбереження (м. Київ).

У розрідженій спермі після додавання наноцитратів металів у відповідних концентраціях визначали наступні показники: споживання оксисену, відновну здатність, активність сукцинатдегідрогенази та виживання сперматозоїдів (год) за температури 2-4 °С до припинення прямолінійного поступального руху.

Статистичний аналіз отриманих результатів проведено методом варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента і η – кореляційного відношення за М.О. Плохінським [25] та із застосуванням персонального комп'ютера. Різницю між середніми арифметичними значеннями вважали статистично вірогідною: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

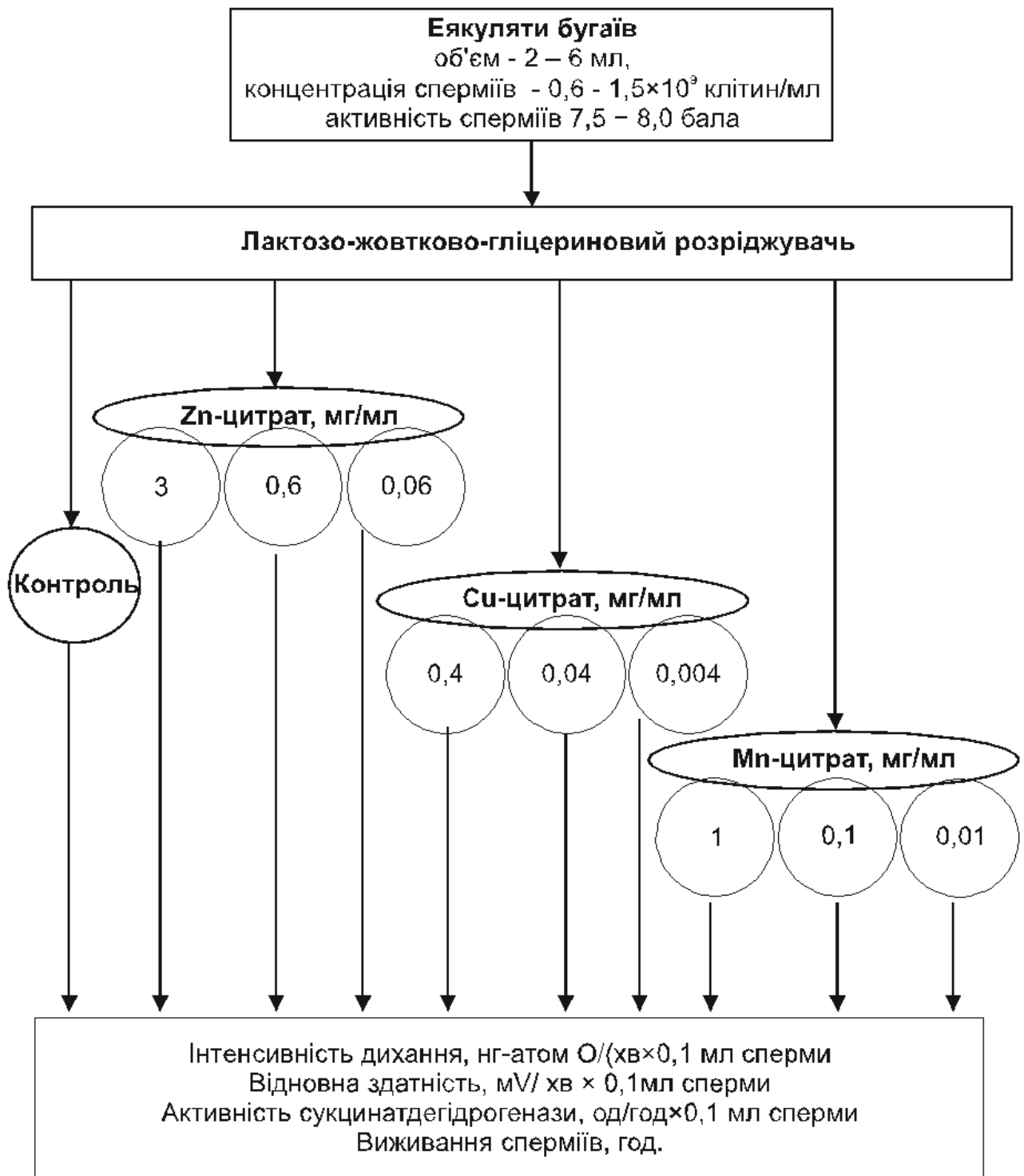


Рис. 2.1. Схема проведення експериментів

2.1. Оцінювання дихальної активності та відновлювальної здатності сперми

Дихальну активність сперми вивчали полярографічно (нг-атом $O/(xv \times 0,1$ мл сперми; С) з використанням електрода Кларка, який вмонтований у термостатовану комірку (температура $38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$), об'ємом 1,0 мл. Відновлювальну здатність — потенціометрично ($mV/$ хв. $\times 0,1$ мл С) з використанням системи відкритих мікроелектродів, які вставляли в полярографічну комірку. В якості позаклітинного акцептора електронів використовували калію фериціанід ($K_3[Fe(CN)_6]$; K_3 ; 10^{-4}M). Таким чином, ми мали змогу оцінювати як процеси споживання оксисену, так і зміни потенціалу в середовищі культивування (транспорт електронів і протонів, позаклітинний простір). Дихальну активність сперми реєстрували само пишучим потенціометром КСП-2 [35]. Дослідження інтенсивності дихання сперми проводили за температури $38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ у фосфатно-сольовому буфері (ФСБ; $NaCl - 0,8$ г, $KCl - 0,02$ г, $Na_2HPO_4 - 0,11$ г, $KH_2PO_4 - 0,02$ г, $MgCl_2 - 0,01$ г, $H_2O -$ до 100 мл).

2.2. Визначення активності сукцинатдегідрогенази (СДГ) у спермі бугаїв

Принцип методу. Спосіб визначення активності СДГ ґрунтується на здатності 2-, 3-, 5-трифенілтетразолію хлористого під дією ензиму відновлюватися до червоного формагану. В результаті чого досліджувана суміш набуває рожевого забарвлення, інтенсивність якого залежить від активності СДГ.

Обладнання та реактиви. 0,2 % розчин 2-,3-,5-трифенілтетразолію хлористого на фосфатному буфері; 0,2 М Na-K-фосфатний буфер (рН 7,4); 0,2 М розчин сукцинату; метанол; хлороформ; піпетки (1,0; 5,0 мл); водяний термостат (сухо повітряний з водяною банею); фотоелектроколориметр.

Хід визначення. Суміш, що містить 0,1 мл сперми і 0,5 мл розріджувача, 0,5 мл 0,2 % розчину 2-,3-,5-трифенілтетразолію та 0,5 мл 0,2 М натрію

сукцинату інкубують впродовж 2 год за температури 37-38 °С. Паралельно з дослідними пробами готують контрольну, в якій інкубують 0,5 мл розріджувача з відповідними реактивами. Після інкубації до проб додають 3 мл метанолу, через 15 хв – 3 мл хлороформу. Верхній шар коагульованих білково-ліпідних конгломератів відсмоктують за допомогою водоструменевої помпи, нижній – колориметрують у кюветі, товщиною робочого шару 5 мм, за довжини хвилі 490 нм проти контрольної проби.

Активність ензиму виражають в умовних одиницях екстинції (Од): різницю між дослідною та контрольною пробами перемножують на 100 і одержану величину приймають за активність СДГ; мкМ/ хв./ л (нМ/ сек./ л) – для чого готують 0,001 М розчин червоного формазану в хлороформі (молекулярна маса 300; 1 мл такого розчину 1 мкМ або 300 мкг формазану) та додають його відомі кількості до розріджувача сперми. Наступні процедури проводять аналогічно визначенню активності ензиму в спермі. Відповідно до отриманих екстинцій будують калібрувальну криву, перевівши одиниці оптичної густини у мікромолі утвореного формазану.

Таблиця 2.1

Схема побудови калібрувального графіка для визначення активності СДГ у спермі

№ пробірки	Калібрувальний розчин формазану, мл	Вміст формазану в пробі, мкМ	Дистильована вода, мл	Розріджувач сперми, мл	Сперма, мл	Метанол, мл	Хлороформ, мл	Оптична густина проби, Е (Од)	Активність СДГ, мкМ/ (хв•л)
1	0,01	0,01	0,99	0,5	0,1	3	3	0,01	0,83
2	0,05	0,05	0,95	0,5	0,1	3	3	0,13	5,00
3	0,10	0,10	0,90	0,5	0,1	3	3	0,26	8,33
4	0,15	0,15	0,85	0,5	0,1	3	3	0,39	12,50
5	0,20	0,20	0,80	0,5	0,1	3	3	0,52	16,67

Для спрощення визначення активності СДГ і запліднювальної здатності сперматозоїдів можна використовувати тест-пробірки. Для цього у пробірки додають розчин формагану (табл. 2.1, рис. 2.2), кількість якого (мкМ) рівнозначна вмісту тетразолію, відновленого за відповідної активності СДГ, воду дистильовану і розріджувач сперми. Після того в них додають 1-2 краплі фенолу (консервант), щільно закривають корками і зберігають у темному місці за температури 2-4 °С. За вказаних умов забарвлення не змінюється впродовж 14-18 місяців [33].



Рис. 2.2. Стандарт для визначення активності сукцинатдегідрогенази, Од

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Вивчення впливу добавок до розріджувача сперми окремих мікроелементів у формі цитратів на активність СДГ

Як відомо з літературних даних, СДГ (сукцинатдегідрогеназа) є одним із основних ензимів дихального ланцюга, який каталізує зворотну реакцію дегідрування сукцинату в спермі. СДГ міститься лише на внутрішній мембрані мітохондрій статевих клітин. Експериментальними дослідженнями доведений прямий позитивний зв'язок активності сукцинатдегідрогенази з фізіологічними показниками (виживанням, резистентністю) та запліднюючою здатністю сперматозоїдів [33, 40].

Проведеними нами експериментами було встановлено, що додані до розріджувача цитрати мікроелементів по різному впливали на активність сукцинатдегідрогенази, яка рахується інтегральним показником життєздатності та якісної оцінки сперматозоїдів (табл. 3.1). При цьому виявлені неоднозначні зміни значення даного показника не завжди носили дозозалежний характер відносно доданого окремого цитрату мікроелементу. Зокрема відмічалось, що активність сукцинатдегідрогенази в спермі знижувалась за підвищення у розріджувачі концентрації цитрату купруму. Так, найнижчий показник активності СДГ був виявлений за вмісту в розрідженій спермі 0,40 мг/ л цитрату купруму, середній – за 0,040 мг/ л і найвищий – за 0,004 мг/ л. Ці показники відповідно на 60,5; 43,7 і 25,3 % ($P < 0,001-0,01$) нижчі за показники, одержані у контролі. Проте, слід зауважити, що на активність вказаного ензиму не впливала дозозалежно кількість доданих до розріджувача еякулятів цитратів цинку і мангану. Даний показник коливався у межах 40-47 Од./ год \times 0,1 мл сперми. Різниці між одержаними результатами відносно контролю не були вірогідними.

Таблиця 3.1

Вплив цитратів мікроелементів, за додавання їх до розріджувача сперми, на активність сукцинатдегідрогенази

Умови досліджу	Вміст мікроелементу, мг/л	n	Активність СДГ, Од/год×0,1 мл сперми
За додавання цитратів: Zn -	3,0	9	40,0±8,72
	0,6	9	42,8±8,13
	0,06	9	41,1±7,65
η		0,070	
Cu-	0,4	9	17,6±5,68***
	0,04	9	25,1±6,09**
	0,004	9	33,3±6,53
η		0,411	
Mn-	1	11	46,8±7,36
	0,1	11	42,3±8,35
	0,01	11	46,8±7,36
η		0,100	
Контроль	-	53	44,6±3,27

Примітка. Різниця статично вірогідна порівняно з контролем: * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

Отже, як показали проведені дослідження, активність сукцинатдегідрогенази в спермі тварин змінювалась залежно від дози доданого до розріджувача еякулятів цитрату купруму. Це вказує на середньої сили негативну дію ($\eta = 0,41$) цитрату купруму на активність ензиму. Разом з тим активність СДГ майже не залежала від зростаючого рівня у розрідженій спермі

цитратів цинку та мангану. Що свідчить про слабку дію ($\eta = 0,7-0,1$) доданих цитратів мангану й цинку на величину показника активності даного ензиму.

Інгібуючий вплив підвищених концентрацій цитрату купруму на активність СДГ у спермі, можливо, був спричинений надлишковим вмістом даного мікроелементу. Адже відомо, що високі концентрації купруму негативно діють на метаболічні процеси в клітинах, зокрема і в сперматозоїдах.

3.2. Вплив добавок до розріджувача сперми цитратів мікроелементів на показники виживання сперматозоїдів

Нами було виявлено, що при додаванні до розріджувача сперми цитратів цинку і мангану, показник виживання сперматозоїдів не змінювався, порівняно до контрольного показника і становив 126,2-134,9 год, що продемонстровано у таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Вплив цитратів мікроелементів, за додавання їх у розріджувач, на виживання сперматозоїдів, ($M \pm m$)

Умови досліджу	Вміст мікроелементу, мг/л	n	Вживання, год
За додавання цитратів: Zn -	3,0	10	126,2±9,48
	0,6	10	130,0±6,96
	0,06	10	132,0±6,12
η		0,077	
Cu-	0,4	9	112,0±7,54*
	0,04	10	122,4±7,16
	0,004	10	127,3±9,63
η		0,209	

Продовження табл. 3.2

Mn-	1	11	133,1±8,56
	0,1	11	134,9±10,88
	0,01	11	131,0±10,39
η		0,031	
Контроль	-	54	132,0±4,47

Примітка. Різниця статично вірогідна порівняно з контролем: *P < 0,05

Проте, за підвищення концентрації цитрату купруму в розріджуваному середовищі вірогідно знижувалась на 15,3 % (P < 0,05) величина значення фізіологічного показника за максимального рівня сполуки купруму з лимонною кислотою (0,40 мг/л) у розріджувачі сперми. Аналогічну дію було виявлено в експериментах на кроликах і бугаях за вивчення впливу різних доз йонів купруму в розріджених еякулятах на фізіологічний стан сперматозоїдів тварин.

За збільшення рівня купруму порушується цілісність мембран, що в результаті призводить до структурних змін у ділянці шийки, тіла і акросоми сперматозоїда, гальмування його рухливості та в кінцевому результаті до зменшення терміну виживання [37, 38].

3.3. Вплив доданих до розріджувача сперми цитратів мікроелементів на її дихальну активність і відновлювальну здатність

Як відомо з джерел літератури, статеві клітини ссавців є факультативними анаеробами, а їхній рух у безкисневому середовищі забезпечується за рахунок вуглеводів, зокрема фруктози, глюкози і манози, які вони мають можливість засвоювати з зовнішнього середовища. За присутності ж кисню сперматозоїди одержують енергію для свого руху за катаболізму білків, вуглеводів і ліпідів [18, 39]. Окрім цього кисень споживається і

плазмою сперми, а не тільки сперматозоїдами, що обумовлено присутністю у ній аутооксидабельних речовин [18]. Зважаючи на це, при катаболізмі субстратів накопичується енергія у формі макроенергетичних зв'язків АТФ і проходить відновлення акцептора електронів – молекулярного кисню. Інтенсивність дихання сперматозоїдів позитивно пов'язана з якісними фізіологічними показниками сперми та її запліднювальністю і відсотком виживання потомства.

При дослідженні нами дихальної активності сперми за умови додавання до розріджених свіжо одержаних еякулятів бугаїв мікроелементів у формі цитратів, було виявлено зменшення значення отриманого показника у порівнянні до такого у контролі. Зокрема, за додавання до розріджувача еякулятів цитрату цинку у концентрації 0,60 мг/л і цитрату мангану – 0,10 мг/л відповідно на 46 % та 40 % ($P < 0,05$) знижувалася дихальна активність сперми, а за додавання цитрату купруму (0,040 мг/л) – на 35 % у порівнянні до дихальної активності сперми у контрольних тварин. Одержані дані представлено у таблиці 3.3 і на рисунку 3.1.

Таблиця 3.3

Вплив цитратів мікроелементів, за додавання їх у розріджувач еякулятів, на дихальну активність сперми ($M \pm m$)

Умови досліджу	Вміст мікроелементу, мг/л	n	Дихальна активність, нг-атом O/ хв × 0,1 мл сперми
За додавання цитратів: Zn-	3,0	4	0,96±0,24***
	0,6	4	1,30±0,33**
	0,06	4	1,60±0,31*
η			0,475
Cu-	0,4	5	0,78±0,13***

Продовження табл. 3.3

	0,04	5	1,12±0,22***
	0,004	5	1,70±0,32
η			0,544
Mn-	1,0	4	0,80±0,11***
	0,1	4	0,80±0,17***
	0,01	4	1,40±0,36*
η			0,565
Контроль	-	16	2,60±0,30

Примітка. Різниця статично вірогідна порівняно з контролем: *P < 0,05;
** P < 0,01; *** P < 0,001

Виявлено, що при збільшенні вмісту цитратів мікроелементів у десять разів у розріджувачі сперми знижується її дихальна активність у порівнянні з даними, отриманими за додавання мінімальних доз цитратів мікроелементів, а також у порівнянні з контролем. Зокрема, найменше споживання кисню знижувалось за додавання до розріджувача 0,60 мг/л цитрату цинку – на 50 % (P < 0,01), більше – за 0,040 мг/л цитрату купруму – на 57 % (P < 0,001), найбільше – за 0,10 мг/л цитрату мангану – на 69 % (P < 0,001).

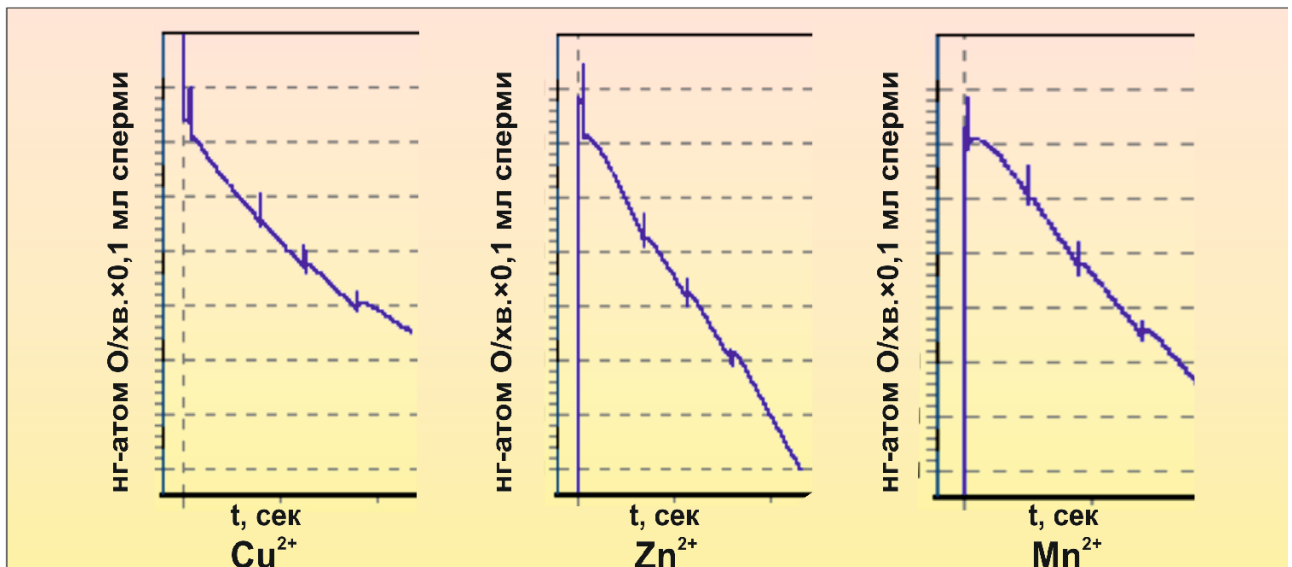


Рис 3.1. Динаміка змін дихальної активності сперми за додавання до розріджувача цитратів купруму, цинку і мангану

При підвищенні концентрацій цитратів мангану і купруму в розрідженій спермі ще у десять разів спостерігалась найнижча її дихальна активність, відповідно $0,77-0,8$ нг-атом $O/хв \times 0,1$ мл сперми. Аналогічно і за підвищення у п'ять разів цитрату цинку виявлено найнижчу дихальну активність сперми – $0,95 \pm 0,23$ нг-атом $O/хв \times 0,1$ мл сперми. Отримані результати відповідно в 3,1, 3,3 і 2,6 рази нижчі ($P < 0,01$), ніж значення даного показника у контролі.

При дослідженні відновлювальної здатності сперми, на відміну від дихальної її активності, істотних змін за додавання цитратів мікроелементів до розріджувача не виявлено. Так, значення даного показника в зразках сперми при мінімальній концентрації цитратів купруму та цинку в розріджувачі еякулятів знаходилось на рівні контрольного значення і становило $0,13-0,15$ мВ/ хв $\times 0,1$ мл сперми. При додаванні $0,10$ мг/ цитрату мангану воно на 69 % знижувалось ($P < 0,05$). Отримані результати продемонстровані у таблиці 3.4 і на рисунку 3.2.

Таблиця 3.4

Вплив цитратів мікроелементів, за додавання їх до розріджувача, на відновлювальну здатність сперми ($M \pm m$)

Умови досліджу	Вміст мікроелементу, мг/л	Відновна здатність, мV/хв×0,1мл сперми			
		п	«-» відтік протонів з середовища розрідження	п	«+» потік протонів у середовище розрідження
За додавання цитратів: Zn-	3,0	1	0,10±0,00	3	0,01±0,004
	0,6	2	0,10±0,04	2	0,03±0,002
	0,06	4	0,14±0,05	-	-
η		0,262		-	
Cu-	0,4	2	0,19±0,02	2	0,01±0,002
	0,04	3	0,22±0,04	2	0,014±0,003
	0,004	2	0,16±0,06	3	0,002±0,001
η		0,161		-	
Mn-	1,0	2	0,06±0,03	2	0,002±0,0002
	0,1	3	0,11±0,07	1	0,02±0,00
	0,01	3	0,05±0,01*	1	0,01±0,00
η		0,346		-	
Контроль	-	16	0,16±0,04	6	0,01±0,003

Примітка. Різниця статично вірогідна порівняно з контролем: *P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

Потрібно зазначити, що при додаванні до розріджувача цитрату цинку в кількості 0,60 мг/ л у середовище інкубування потоку протонів не було

виявлено, на відміну від контрольних зразків сперми тварин, а також від окремих зразків при додаванні цитратів купруму й цинку. Разом з тим, досліджуючи відновлювальну здатність сперми при подальшому збільшенні у розріджувачі еякулятів концентрації цитратів мікроелементів до максимального рівня достовірних змін відтоку протонів із середовища інкубування не було відмічено. Також слід додати, що у позаклітинному середовищі фіксувалось накопичення протонів, яке не залежало від вмісту цитратів купруму і мангану в розбавнику. Однак воно відбувалось за підвищення у розріджувачі концентрації цитрату цинку більше, ніж 0,60 мг/ л.

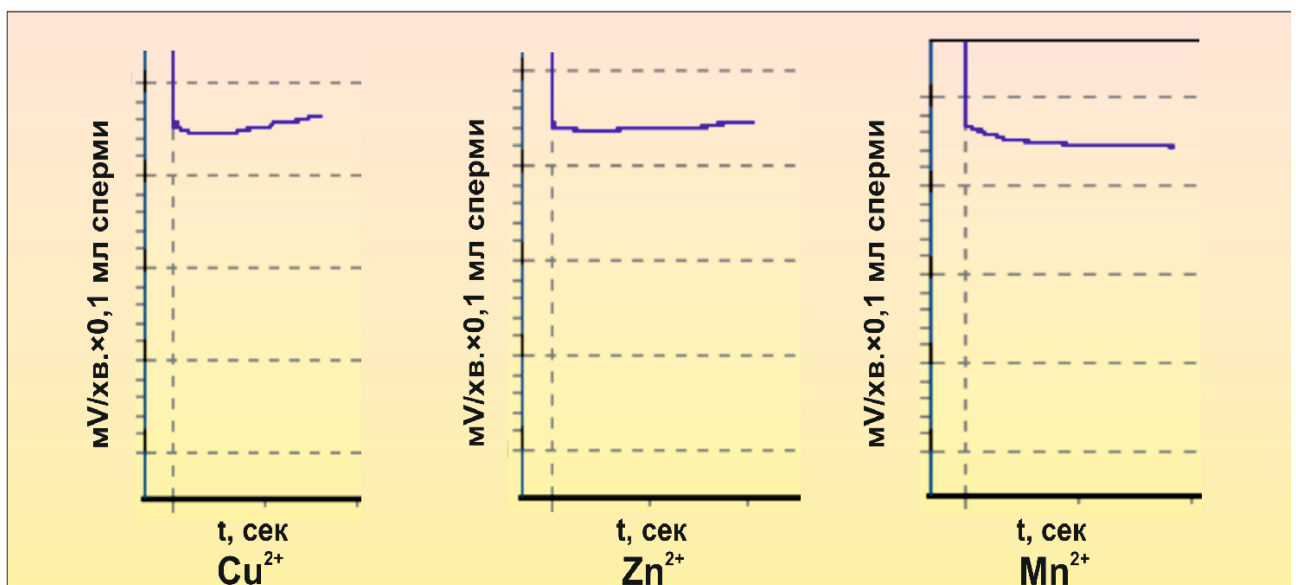


Рис. 3.2. Динаміка змін відновлювальної здатності сперми за додавання до розріджувача еякулятів цитратів окремих мікроелементів

Аналізування кореляційних взаємозв'язків між зростанням рівня цитратів мікроелементів і відновлювальною здатністю та дихальною активністю сперми вказує на те, що дані комплекси органічних сполук, проникаючи в статеві клітини, чинять регулювальну дію на інтенсивність процесів окиснення в розріджених еякулятах тварин. Причому, було встановлено, що підвищені концентрації цитратів купруму та мангану в складі розріджувача проявляють

більший ефективний вплив на дихальну активність сперми – відповідно $\eta = 0,54$ і $0,57$, а цитрат цинку – навпаки, менший – $\eta = 0,48$.

Підсумовуючи вищесказане, можна констатувати, що вміст у розрідженій спермі $0,040$ мг/ л цитрату купруму, $0,060$ мг/ л цитрату цинку та $0,010$ мг/ л цитрату мангану є оптимальним. Такий вміст вказаних цитратів мікроелементів виявляє найменшу пригнічуючу дію на накопичення протонів у позаклітинному середовищі та дихальну активність сперми.

Загалом, одержані результати досліджень свідчать про те, що з метою балансування складу розріджувача еякулятів бугаїв до фізіологічних меж та нормалізування окисного метаболізму, а також забезпечення тривалішого терміну виживання сперматозоїдів необхідно до середовища розрідження додавати цитрати купруму, цинку й мангану в кількостях у десять-двадцять разів нижчих, ніж їхніх аналогів у формі неорганічних солей. Ці дані узгоджуються із результатами, висвітленими у літературних джерелах стосовно досліджень вмісту мікроелементів у спермі бугаїв [27].

ВИСНОВКИ

У результаті проведених досліджень можна зробити наступні висновки:

1. Мікроелементи у формі цитратів, проникаючи в сперматозоїди тварин, проявляють регулюючу дію на інтенсивність окиснювальних процесів у еякулятах, розбавлених лактозо-жовтково-гліцериним розріджувачем.

2. З метою нормалізації складу розріджувача до фізіологічних меж нативних еякулятів, окиснювальних процесів і забезпечення більш тривалого терміну виживання статевих клітин бугаїв потрібно додавати до лактозо-жовтково-гліцериним середовища цитрати цинку, мангану та купруму в кількостях у десять-двадцять разів менших, у порівнянні до їхніх аналогів у вигляді неорганічних солей.

3. Встановлено, що вміст цитрату цинку – 0,060 мг/ л, мангану – 0,010 мг/ л та купруму – 0,0040 мг/ л є оптимальним, завдяки чому в розрідженій спермі відбувається нормалізація інтенсивності окисних процесів.

4. Тривалість виживання сперматозоїдів за оптимального вмісту цитратів мікроелементів у спермі складає 127,3-132,9 год за температурного режиму від 0 до 4 °С.

5. У розріджувач сперми не доцільно додавати більше, ніж 0,0040 мг/ л цитрату купруму, так як при цьому активність ензиму-маркера запліднюючої здатності сперматозоїдів – СДГ пригнічується, а тривалість їх виживання зменшується.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Влізло В. В. Біологічна дія функціональних наноматеріалів у різних видів тварин / В. В. Влізло, Р. С. Федорук, Р. Я. Іскра // Вісник аграрної науки. Львів, 2018. № 11 (788). С. 80–86.
2. Гримак Х. М. Кріоконсервування сперми баранів-плідників за використання синтетичних середовищ / Х. М. Гримак // Науковий вісник ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького. Серія: Сільськогосподарські науки. Львів, 2020. Т. 22, № 92. С. 62–70.
3. Двилюк І. І. Вміст ліпідів у тканинах організму медоносних бджіл за умов підгодівлі цитратами аргентуму і купруму у літньо-осінній період / І. І. Двилюк, І. І. Ковальчук, Л. І. Романів // Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок і інституту біології тварин. Львів, 2018. Випуск 19, № 2. С. 58–64.
4. Двилюк І. І. Репродуктивна здатність бджолиних маток за умов підгодівлі цитратами Ag і Cu / І. І. Двилюк, І. І. Ковальчук // Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. Львів, 2016. Випуск 17, № 2. С. 101–107.
5. Долайчук О. П. Фізіологічний вплив наноцитрату германію в умовах його випоювання лактуючим сямкам шурів та їх приплоду / О. П. Долайчук, Р. С. Федорук, В. Г. Каптувенко // Фізіологічний журнал. 2014 (додаток). Том 60, № 3. С. 222–223.
6. Іваницька А. І. Фізіолого-біохімічні процеси організму та продуктивність кролів за випоювання сполук силіцію / А. І. Іваницька, Я. В. Лесик // Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. Львів, 2017. Випуск 18, №1. С. 42–47.
7. Іскра Р. Я. Фізіолого-біохімічні процеси в організмі шурів за дії хром хлориду та хром цитрату / Р. Я. Іскра, Н. О. Салига, О. З. Сварчевська, І. Я.

Максимович // *Фізіологічний журнал*. 2014 (додаток). Том 60, № 3. С. 226–227.

8. Клименць Г. В. Вплив цитрату ванадію на активність ензимів вуглеводневого обміну в еритроцитах самців і самок щурів / Г. В. Клименць, Р. Я. Іскра, О. З. Сварчевська // *Науковий журнал «Біологія тварин»*. Львів, 2018. Том 20 № 4. С. 115.

9. Ковальчук І. І. Вплив вигоювання Mg цитрату медоносним бджолам на їх життєздатність / Ковальчук І. І., Андрюшулік Р. Л. // *Актуальні проблеми фізіології тварин*. Полтава, 2020. С. 50–51.

10. Ковальчук І. І. Мінеральний склад тканин медоносних бджіл в умовах згодовування цитрату германію / І. І. Ковальчук, Р. С. Федорук, А. П. Пашенко // *Фізіологічний журнал*. 2014 (додаток). Том 60, № 3. С. 229.

11. Ковальчук І. І. Репродуктивна здатність бджолиних маток за умов підгодівлі цитратами Co і Ge / Ковальчук І. І., Кижіш І. Б. // *Актуальні проблеми фізіології тварин*. Полтава, 2020. С. 51–52.

12. Kozel A. A. Kurs lektsyi. "Vyotekhnolohyia reproduksyyi sel'skokhoziaistvennykh zhyvotnykh u rytysy" / Dlia studentov fakulteta veterynarnoi medytsyny dnevnoi y zaочноi form obuchenya, spetsyalnost 1-74 03 02 «Veterynarnaia medytsyna». Hrodno: HNAU, 2013. S. 24–42.

13. Корейба Л. В. Практичне акушерство, гінекологія та штучне осіменіння сільськогосподарських тварин: навч. посіб.: Ч. 1. / Л. В. Корейба / Дніпропетровський ДАБУ. Дніпропетровськ, 2016. С. 100–152.

14. Корнят С. Б. Вплив нанокарбоксилатів мікроелементів на життєздатність спермійів кнура за зберігання у лактозо-жовтковому розріджувачі / С. Б. Корнят, І. М. Яремчук, О. Б. Андрушко та ін. // *Актуальні проблеми фізіології тварин*. Полтава, 2020. С. 54–55.

15. Корнят С. Б. Вплив фосфору, калію та сірки, введених у середовище для розбавлення сперми кнурів, на життєздатність спермійів та метаболічні процеси в них / С. Б. Корнят, М. М. Шарац, О. Б. Андрушко, А. Р.

Корбенький // Наук.-тех. Бюл. ІВТ УААН і ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. 2008. Вип. 9, № 3. С. 291–223.

16. Корнат С. Б. Інтенсивність окисних процесів у спермі кнурів за додавання наноструктур металів у розріджувач «Екосперм» / С. Б. Корнат, І. М. Яремчук, О. Б. Андрушко та ін. // Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. Львів, 2019. Випуск 20, № 2. С. 352–357.

17. Корнат С. Б. Інтенсивність окисно-відновних процесів та виживання сперміїв кнурів за додавання в розріджені еякуляти органічної форми (шпратів) мікроелементів / С. Б. Корнат, О. Б. Андрушко, Ю. В. Болнар та ін. // Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. Львів, 2016. Випуск 17, № 2. С. 255–260.

18. Косенко М. В. Репродуктивна функція і андрологічна диспансеризація бугаїв / М. В. Косенко, Б. М. Чухрій, І. Я. Кошомбас, Л. О. Клевещ та ін. Львів, 2007. 186 с.

19. Ладика В. І. Оцінка якості сперми бугаїв-плідників у контексті збереження популяції лебединської породи / В. І. Ладика, Ю. І. Скларенко, Ю. М. Павленко // Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. Львів, 2018. Випуск 19, № 2. С. 254–264.

20. Лесик Я. В. Вплив вживання суспензії хлориду, сульфату натрію, хлориду і шпрату хрому на кролів / Я. В. Лесик, Р. С. Федорук, О. П. Долойчук // Фізіологічний журнал. 2014 (додаток). Том 60, № 3. С. 230.

21. Лесик Я. В. Вплив різної кількості шпратної сполуки I, Se, S на гематологічні та біохімічні показники організму кролів / Я. В. Лесик, О. В. Бойко, О. Ф. Гончар // Актуальні проблеми фізіології тварин. Полтвава, 2020. С. 59–60.

22. Musabekov A. T. Razrabotka effektivnykh komponentov sredy dlia kryokonservatsyyu zremny khriakov: dyss. na soyskanye uch. st. doktora fylosofyy:

6D070100/ Yuzhno-Kazakhstanskyi hosudarstvennyi unyversytet ym. M.O. Auezova. Shymkent, 2012. 159 s.

23. Nekrasov H. D. Akusherstvo, hynekolohyia y byotekhnika vosproyvodstva zhivotnykh: uchebnoe posobyе / H. D. Nekrasov, Y. A. Sumanova. Barnaul: Yzd-vo ANAU, 2007. S. 48-63.

24. Пащенко А. Г. Уміст загальних ліпідів та жирних кислот у тканинах медоносних бджіл у період весняної підгодівлі борошном сої та штратами Co і Ni / Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. Львів, 2016. Випуск 17, № 2. С. 48–54.

25. Plokhynskiy N. A. Vyometrya. M.: MNU. 1970. S. 53–60.

26. Слівінська О. М. Коригувальний вплив штратів хрому і цинку на NO-синтазу активність еритроцитів щурів зі стрептозотоциновим діабетом / О. М. Слівінська, Р. Я. Іскра // Науковий журнал «Біологія тварин». Львів, 2020. Том 22, № 2. С. 38–42.

27. Смірнов І. В. Штучне осіменіння сільсько-господарських тварин. К., Видавництво «Вища школа», 1976. 256 с.

28. Тесарівська У. І. Сенсорно-рухові рефлекси та поведінкові реакції щурят F2 за дії на організм матерів різних доз штрату наногерманію / Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. Львів, 2017. Випуск 18, № 1. С. 162–168.

29. Тесарівська У. І. Біологічний вплив тривалого вживання наногерманію штрату на організм щурів-самців F3 / У. І. Тесарівська, Р. С. Федорук, Н. В. Шкодяк та ін. // Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. Львів, 2018. Випуск 19, № 2. С. 30–36.

30. Федорук Р. С. Фізіологічна залежність змісту важких металів у тканинах бджіл за агроекологічних умов карпатського регіону та дії штратів наночастинок хрому, селену, германію / Р. С. Федорук, І. І. Ковальчук // Фізіологічний журнал. 2014 (додаток). Том 60, № 3. С. 239–240.

31. Хомин М. М. Антиоксидантний профіль крові корів та якість молока за згодовування аквагідрату йоду і цитратів хрому, селену, кобальту та цинку / М. М. Хомин, І. І. Ковальчук, С. Й. Кропивка // Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. Львів, 2016. Випуск 17, №2. С. 129–134.

32. Хомин М. М. Фізіолого-біохімічні показники крові корів, за умов згодовування цитрату нікелю в останній період тільності та в перші місяці лактації / М. М. Хомин, О. І. Колешук, І. І. Ковальчук, та ін. // Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. Львів, 2018. Випуск 19, № 2. С. 37–41.

33. Чухрій Б. М. Колориметричний спосіб визначення активності сукцинатдегідрогенази в спермі бугаїв / Б. М. Чухрій, Л. О. Клевещь, Д. Д. Остапів // Вісник аграрної науки. 1995. № 11. С. 73–75.

34. Шаран М. М. Якість сперміїв за додавання наносукцинатів металів у розріджені еякуляти баранів / М. М. Шаран, С. Б. Корнят, І. М. Яремчук та ін. // Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. Львів, 2018. Випуск 19, № 2. С. 273–279.

35. Shtolts K. F. Amperometrycheskoe opredelenye ferrotsyanyda v pryzutstvyy subkletochnykh struktur / K. F. Shtolts, Y. M. Mosolova, L. A. Dronova // Vyokhymycheskyye metody. M.: Nauka, 1980. S. 147–150.

36. Яремчук І. М. Інтенсивність окисних процесів та якість сперміїв бугаїв за додавання у розріджувач цитратів мікроелементів / І. М. Яремчук, Ю. В. Боднар, Н. В. Кузьміна, та інші // Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. Львів, 2016. Випуск 17, № 2. С. 88–94.

37. Goldberg E. Isozymes in testis and spermatozoa // Isozymes. 1977. Vol. 1. P. 77–86.

38. Mariano B. G. Acrosomal exocytosis of mouse sperm progresses in a consistent direction in response to zona pellucida / Mariano B. G., Esmeralda R.-M., Bayard S. T. // J. Cell. Physiol. 2009. Vol. 220. P. 611–620.

39. Neagu V. R. Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in canine seminal plasma and its relation with sperm quality and lipid peroxidation post thaw / Neagu V. R., Garcia B. M., Rodriguez A. M., Ferrusola C. O., Bolanos J. M. et al. // *Theriogenology*. 2011. Vol. 75, N. 1. P. 10-16.