

**ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО**

На правах рукопису

УДК: 612.616.2:612.592:612.014.6

МАКСИМЮК ГАННА ВАСИЛІВНА

**Біохімічні особливості впливу трансмембранних змін гомеостазу іонів на
життєздатність сперматозоїдів за умов кріопротекції**

03.00.04 – біохімія

**Дисертація
на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук**

**Науковий консультант:
доктор біологічних наук,
професор ВОРОБЕЦЬ
ЗІНОВІЙ ДМИТРОВИЧ**

Львів – 2016

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1	14
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	14
1.1. Роль органічних та неорганічних компонентів секретів репродуктивної системи у розвитку чоловічих гамет	14
1.2. Гомеостаз іонів відкритих систем типу "середовище-клітина"	17
1.3. Вплив біохімічних процесів на розвиток трансмембранних дефектів сперматозоїдів за дії етапів технології кріоконсервації сперми	24
1.4. Механізм дії кріопротекторів на стан структури й функцій статевих клітин	35
1.5. Регуляція метаболічних шляхів в системі "середовище-клітина"	43
РОЗДІЛ 2	47
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	47
2.1. Матеріали досліджень	47
2.1.1. Тканини органів статевих систем самців і самок	47
2.1.2. Сперма, спермальна плазма, сперматозоїди	50
2.2. Методи досліджень	53
2.2.1. Визначення концентрації вільних та зв'язаних іонів	53
2.2.2. Способи одержання сперми	54
2.2.3. Визначення концентрації сперматозоїдів в еякулятах	58
2.2.4. Визначення рухливості сперматозоїдів	60
2.2.5. Визначення кількості живих і мертвих сперматозоїдів	60
2.2.6. Визначення тривалості виживання сперматозоїдів	61
2.2.7. Оцінювання стану структури сперматозоїдів	62
2.2.8. Визначення параметрів концентрації Ca^{2+} , K^{+} , Na^{+} у спермальній плазмі та сперматозоїдах	67

2.2.9.	Встановлення способу переміщення іонів у системі "середовище-клітина"	71
2.2.10.	Методологія оцінювання стану структури й функцій сперматозоїдів	72
2.2.11.	Визначення активності Ca^{2+} - та Na^{+} -залежних АТФ-гідролазних систем у сперматозоїдах	80
2.2.12.	Визначення концентрації вищих насичених і ненасичених жирних кислот у спермальній плазмі та сперматозоїдах	86
2.2.13.	Визначення концентрації про- і протизапальних інтерлейкінів у спермальній плазмі	86
2.2.14.	Методика статистичного аналізу результатів досліджень	87
РОЗДІЛ 3		90
ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ		90
3.1.	Особливості гомеостазу Ca^{2+} , K^{+} , Na^{+} у тканинах статевих органів	90
3.1.1.	Гомеостаз вільних і зв'язаних іонів	91
3.2.	Особливості структури й функцій сперматозоїдів відкритої системи "середовище - клітина"	110
3.2.1	Стан акросоми й цитоплазматичної мембрани	110
3.2.2.	Гомеостаз іонів лужних металів.....	120
3.2.3.	Гомеостаз молекул жирних кислот.....	124
3.3.	Зв'язок гомеостазу іонів з концентрацією сперматозоїдів.....	144
3.4.	Зв'язок гомеостазу іонів з породою і віком плідників.....	158
3.5.	Параметри концентрації іонів, активності та концентрації молекул біологічно активних сполук за дії ендогенних чинників.....	167
3.6.	Реакція системи "середовище-клітина" на дію екзогенних чинників	185
3.6.1.	Трансмембранні зміни гомеостазу іонів	187
3.6.2.	Особливості змін функціонального стану сперматозоїдів	

за дії умов технології кріоконсервації сперми	201
3.7. Способи мінімізації шкочинного впливу захисних середовищ	203
РОЗДІЛ 4	224
АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	224
ВИСНОВКИ	241
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	244

Скорочення використаних термінів і словосполучень

АДФ	– аденозиндифосфат
АСКБ	– альбумін сироватки крові бугая
АТФ	– аденозинтрифосфосфат
ВКК	– висока концентрація іонів калію
ЖК	– жирні кислоти
ВРК	– водні розчини кріопротекторів
ДМСО	– диметилсульфоксид
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота
ЕГ	– етиленгліколь
ЗС	– захисне середовище
ЗС _д	– захисне середовище (дослід)
ЗС _к	– захисне середовище (контроль)
ІЛ	– інтерлейкіни
НКК	– низька концентрація іонів калію
ПВП	– полівінілпірролідон
ПВФА	– полівінілформальдегід
ПЕО	– поліетиленоксид
СКК	– середня концентрація іонів калію
SH	– сульфгідрильна група
SS	– дисульфідна група
ТКС	– технологія кріоконсервації сперми
ТМД	– трансмембранні дефекти
ТМП	– трансмембранні переміщення
ТХО	– трихлороцтова кислота
ФВЕ	– фракції водних екстрактів
ЯМР	– ядерномагнітний резонанс

ВСТУП

Актуальність теми. Експериментальні дослідження особливостей біохімічних змін нативного стану структури й функцій сперматозоїдів, спрямовані на виявлення особливостей механізмів адаптивної реакції статевих клітин за дії чинників моно- і полікомпонентних захисних середовищ (ЗС) та етапів технології кріоконсервації сперми (ТКС) до -196°C , сьогодні є особливо актуальними.

Сумарна дія впроваджених у практику сучасних способів (технологія) і засобів (кріопротектори) захисту, забезпечує збереження лише 30...35 % функціонально повноцінних клітин у деконсервованих спермодозах. До того ж сперматозоїди деконсервованих спермодоз мають знижені майже в два рази щодо нативної сперми показники рухливості й запліднювальної здатності [25, 120, 188]. Зважаючи на вказане, важливою є розробка об'єктивних методологічних прийомів оцінювання особливостей змін екзоструктури сперматозоїдів (акросома, цитоплазматична мембрана), життєздатності (рухливість, відсоток живих і мертвих клітин, тривалість виживання, запліднювальна здатність тощо) та гомеостазу іонів і молекул біологічно активних речовин у системі "середовище - клітина", а також пошук нових, більш ефективних способів захисту клітин, які в майбутньому допоможуть звести до мінімуму негативну дію чинників ТКС на функціональну повноцінність сперматозоїдів у деконсервованих спермодозах та підвищити ефективність і рентабельність роботи біотехнологічних центрів репродукції людини і тварин.

Відомо, що внутрішньоклітинний гомеостаз Ca^{2+} , K^{+} , Na^{+} досягається завдяки складній і координованій системі їх пасивного та активного транспорту. Транспортні АТФази ($\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -, Mg^{2+} -) регулюють інтенсивність переміщення іонів у відкритих і закритих системах типу "середовище - клітина", координують перебіг фізичних і біохімічних процесів, які ініціюють рухливість, капаситацію і акросомну реакцію сперматозоїдів,

формують на їх мембранах електрохімічний градієнт концентрації іонів [36, 67, 108]. Зміна активності Ca^{2+} -транспортувальних систем впливає не лише на внутрішньоклітинний гомеостаз Ca^{2+} , але й на гомеостаз K^+ і Na^+ тканин органів статевої системи самок [159, 425, 515].

Результати детального вивчення особливостей енергозалежного й незалежного трансмембранного переміщення іонів лужних металів у відкритих і закритих системах, що запускає в дію механізми рухливості сперматозоїдів, акросомальної реакції, penetрації й запліднення яйцеклітини, допоможуть з'ясувати не лише окремі ланки адаптивної реакції на вплив екзогенних чинників, але й відкорегувати стан динамічної рівноваги вмісту іонів неорганічних та молекул органічних біологічно активних речовин у ЗС.

На функціональну повноцінність сперматозоїдів нативної та кріоконсервованої сперми впливає співвідношення концентрації жирних кислот (ЖК) між спермальною плазмою і сперматозоїдами. Ліпіди, які є базовими компонентами цитоплазматичних мембран, формують функціональний стан елементів їх структури, регулюють процеси метаболізму органічних сполук у системі "середовище - клітина", забезпечують роботу механізмів капаситації та penetрації сперматозоїдів у яйцеклітину [43, 330, 347, 353, 354, 448].

Із рівнем запліднювальної здатності сперматозоїдів пов'язані концентрації про- (IL-6, IL-8) та протизапальних (IL-10) інтерлейкінів. Їх вміст у спермальній плазмі залежить від інтенсивності генеративних процесів, що відбуваються у клітинах тканин статевих органів самця (інтерстиціальні клітини, клітини Сертолі, сперматогонії). Ці мультифункціональні сполуки беруть активну участь у передачі внутрішньоклітинних сигналів, регулюють ріст і диференціацію зародкових клітин, репродуктивну й нейроендокринну функції, забезпечують процеси сперматогенезу. Особливою ознакою гомеостазу вказаних сполук є їх взаємний зв'язок. Клітини репродуктивної системи самців не тільки продукують інтерлейкіни, але й регулюють інтенсивність їх утворення. Якщо продукція інтерлейкінів послаблюється, то функціонування системи порушується. У статевих органах відбуваються

процеси, розвиток яких призводить до неплідності самців [19, 30, 239, 396, 420, 447].

Сучасні технології кріоконсервації сперми все ще потребують фундаментальних методів розв'язання вказаних проблем. Для об'єктивного оцінювання ступеня змін структури (акросома, цитоплазматична мембрана) й функцій (гомеостаз іонів і молекул біологічно активних речовин) сперматозоїдів параметрами абсолютних і відносних показників, пропонуємо визначати їх динаміку у відкритих і закритих системах "середовище - клітина" за дії ендо- (Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , ЖК, АТФази, інтерлейкіни) і екзогенних чинників (моно- і полікомпонентні ЗС, етапи ТКС). Для цього ми розробили, апробували, стандартизували й адаптували у дослідний процес ряд власних методик та способів аналізу виконаних досліджень [145, 146, 152, 161].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконували у рамках 7-ми науково-дослідних тем: 1. "Роль іонів кальцію, калію, натрію і транспортних АТФаз у збереженні біологічної повноцінності сперматозоїдів" (ДР № 019U024411); 2. "Вивчити механізми регуляції обмінних процесів у репродуктивних органах, ооцитах і ембріонах та розробити способи стимуляції процесів відтворення. Удосконалити склад інкубаційних середовищ для запліднення *in vitro*" (ДР № 198U009013); 3. "Вивчити особливості формування гомеостазу іонів у тканинах репродуктивних органів бугаїв" (ДР № 0106U003842); 4. "Розробити нові біотехнологічні методи оцінки функціональної повноцінності сперматозоїдів свіжоотриманої і кріоконсервованої сперми" (ДР № 0108U006303); 5. "Дослідження функціонально-метаболических резервів стреслімітуючих систем організму за екстремальних умов з метою виявлення ефективних способів їх корекції" (ДР № 0111U000121); 6. "Розробити методологію вивчення особливостей гомеостазу в тканинах статевих органів бугаїв та виділеної ними сперми" (ДР № 0111U005339); 7. "Розробити систему комплексної оцінки життєздатності сперматозоїдів нативної і кріоконсервованої сперми за біохімічними показниками" (ДР № 0111U005340).

Мета і задачі дослідження. Мета роботи – з'ясувати біохімічні особливості реакції сперматозоїдів на зміни їх іонного, жирнокислотного та цитокінового гомеостазу за умов кріоконсервації.

Для реалізації поставленої мети вирішували такі основні завдання:

- розробити методику і способи оцінювання особливостей трансмембранних змін гомеостазу іонів лужних металів, молекул насичених і ненасичених, естерифікованих і неестерифікованих форм ЖК, активності транспортних АТФаз, концентрації про- і протизапальних інтерлейкінів у спермі;
- визначити розподіл концентрації Ca^{2+} , K^+ , Na^+ між спермальною плазмою і сперматозоїдами та зміни стану структури й функцій сперматозоїдів за дії певних екзогенних чинників;
- визначити розподіл концентрації вільних і зв'язаних іонів у фракціях водних екстрактів (ФВЕ) тканин статевих органів бугаїв і корів за дії певних ендогенних чинників;
- визначити розподіл концентрацій жирних кислот між спермальною плазмою та сперматозоїдами у спермі високої якості, концентрацію про- і протизапальних інтерлейкінів у спермальній плазмі та активність транспортних АТФаз у перфорованих мембранах сперматозоїдів при нормо- і патоспермії;
- вивчити особливості адаптивної "реакції - відповіді" сперматозоїдів на дію чинників технології кріоконсервації сперми;
- обґрунтувати механізм збереження повноцінного стану структури й функцій сперматозоїдів за дії певних ендо- і екзогенних чинників;
- запропонувати модель, покликану мінімізувати шкодочинну дію моно- і полікомпонентних захисних середовищ на стан структури й функцій сперматозоїдів та створити нові, більш ефективні розріджувачі сперми.

Об'єкт дослідження: вплив кріопротекторів, ЗС і ТКС на повноцінність стану структури й функцій сперматозоїдів нативної і кріоконсервованої сперми.

Предмет дослідження: особливості концентрації та співвідношень Ca^{2+} , K^+ , Na^+ і ЖК у спермі, концентрації про- і протизапальних інтерлейкінів у

спермальній плазмі, активності транспортних АТФаз у перфорованих мембранах сперматозоїдів, адаптивної реакції сперматозоїдів на дію чинників технології кріоконсервації сперми.

Методи дослідження: визначення концентрації іонів лужних металів проводили за допомогою методу полуменевої фотометрії (Flapho-4); концентрації сперматозоїдів в еякулятах – методу електрофотокolorиметрії (КФК-3); оцінювання їх рухливості й виживання – методу світлової мікроскопії; стану структури акросоми й цитоплазматичної мембрани – методу електронної мікроскопії (УЕМВ-100К); активності транспортних АТФаз – методу спектрофотометрії (СФ-26); концентрації ЖК – методу газової хроматографії (Chrom-5); концентрації інтерлейкінів – методу імуноферментного аналізу (Stat-fax 303). Ступінь абсолютних та відносних змін переміщеного вмісту іонів лужних металів визначали математичними обрахунками. Для статистичного аналізу результатів досліджень використали програму Microsoft Excel. Внесені до методик модифікації визначення показників спермальної плазми, сперматозоїдів і сперми детально описали у розділі ”Матеріали і методи”.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше визначено ліміти і проведено аналіз особливостей змін показників концентрації та її співвідношень між різно- ($\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$, $\text{K}^+:\text{Ca}^{2+}$, $\text{Na}^+:\text{K}^+$) і однойменними ($\text{Ca}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$, $\text{K}^+:\text{K}^+$, $\text{Na}^+:\text{Na}^+$) парами іонів; встановлено їх тісний зв'язок із повноцінністю структури й функцій сперматозоїдів нативної та кріоконсервованої сперми.

Вперше проаналізовано динаміку вільних і зв'язаних форм іонів лужних металів у ФВЕ тканин статевих органів самців і самок; визначено ліміти їх концентрацій у тканинах органів, які виконують захисну, трофічну, генеративну й транспортну функції.

Описано особливості співвідношень концентрації насичених і ненасичених, етерифікованих та неетерифікованих форм ЖК у спермальній плазмі і сперматозоїдах.

Вивчено особливості змін активності транспортних АТФаз у перфорованих мембранах сперматозоїдів та концентрації про- і протизапальних інтерлейкінів у спермальній плазмі за нормо- і патоспермії.

Вперше обґрунтовано і доведено, що стабільність низьких, середніх і високих індивідуальних рівнів концентрації K^+ у спермальній плазмі та сперматозоїдах не пов'язана зі стадіями становлення, стабілізації й згасання репродуктивної функції плідників, їх породою і сезоном парування.

Встановлено, що стан структури акросоми й цитоплазматичної мембрани сперматозоїдів типової форми, їх життєздатність й запліднювальна здатність в еякулятах з низькою й високою концентрацією K^+ зазнає більших змін, ніж з середньою концентрацією.

Доведено, що у відкритих системах "середовище - клітина", залежно від дії чинників ТКС, адаптивна "реакція - відповідь" сперматозоїдів виражена симпортним і/або антипортним способами руху іонів лужних металів.

Практичне значення одержаних результатів. Одержані експериментальні дані розширюють можливості об'єктивного моніторингу й прогнозування рівня запліднювальної здатності сперматозоїдів за визначеними лімітами концентрації та її співвідношень між парами іонів і молекул біологічно активних речовин у нативній та кріоконсервованій спермі.

Виявлену здатність плідників виділяти еякуляти з стабільними, індивідуально постійними показниками концентрації K^+ та з низькою і високою стійкістю мембран сперматозоїдів до дії чинників ТКС можна успішно використовувати для корекції параметрів концентрації кріопротекторів в уже створених ЗС; мінімізації їх негативного впливу на клітину та визначення оптимальних доз для створення нових, більш ефективних розріджувачів сперми.

Широкі ліміти концентрації прозапальних інтерлейкінів у спермальній плазмі та високої активності транспортних АТФаз у перфорованих мембранах сперматозоїдів свідчать про те, що їх можна використовувати для діагностики

розвитку запальних процесів у тканинах генеративних органів статеві системи плідників, а також рівня запліднювальної здатності сперматозоїдів.

Визначені ліміти концентрації ненасичених (лінолева, ліноленова й арахідонова) ЖК та їх здатність за низьких ($-5...-49^{\circ}\text{C}$) температур переходити з твердої фази у рідку можна застосувати для підсилення природної стійкості мембран сперматозоїдів до негативної дії чинників ТКС.

Визначені у ФВЕ тканин ліміти концентрації вільних і зв'язаних іонів та їх бар'єрну, буферну, компенсаторну роль рекомендовано використовувати для обґрунтування зв'язку гомеостазу іонів з продуктами діяльності захисної, трофічної, генеративної і транспортної функцій тканин органів. Це формує оптимальні умови для збереження життєздатності й запліднювальної здатності сперматозоїдів, забезпечує активне переміщення каналами і протоками органів статевих систем самців і самок.

Особистий внесок здобувача. Автор самостійно сформулювала мету та завдання виконаної роботи, розробила і стандартизувала методики, обґрунтувала доцільність застосування введених елементів апробованої методології досліджень. У співавторстві отримала патент на спосіб визначення концентрації вільних та зв'язаних іонів у ФВЕ проб біологічного матеріалу. Самостійно виконала базову експериментальну частину роботи з визначення активності транспортних АТФаз у перфорованих мембранах сперматозоїдів та концентрації інтерлейкінів у спермальній плазмі еякулятів плідних і неплодних чоловіків. В співпраці з науковим консультантом проаналізувала, статистично опрацювала і опублікувала результати досліджень.

У співдружності із працівниками лабораторій Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького та Львівського національного університету імені Івана Франка виконала серію електронномікроскопічних досліджень, спрямованих на визначення ступеня деструкції сперматозоїдів за дії екзогенних чинників; Інституту сільського господарства Карпатського регіону НААН – з визначення лімітів концентрації іонів лужних металів,

насичених і ненасичених етерифікованих і неетерифікованих форм ЖК у спермі.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на міжнародних науково-практичних конференціях: "Механізми функціонування фізіологічних систем" (Львів, 2006); "Биология: от молекулы до биосферы" (Харків, 2007); "Стан, проблеми та перспективи розвитку сучасної аграрної науки і практики" (Львів, 2010); 6 Конгресі патофізіологів України (Сімферополь, 2012); "Наукомісткі технології у сучасному тваринництві" (Харків, 2013); "Сучасні аспекти експериментальної та клінічної біохімії" (Львів, 2013); "Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм" (Тернопіль, 2013); "Фармацевтичні та медичні науки: актуальні питання" (Дніпропетровськ, 2014); VI Пленумі наукового товариства патофізіологів України "Актуальні питання експериментальної та клінічної патофізіології" (Вінниця, 2014); XV Конгресі СФУЛТ (Чернівці-Київ-Чікаго, 2014); Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014); "Ключові питання наукових досліджень у сфері медицини у XXI ст." (Одеса, 2015); "Развитие науки в XXI веке" (Харків, 2015).

Публікації. Публікації представлено у 43 друкованих працях, з них 21 – у рекомендованих МОН України фахових наукових виданнях, 7 з яких включено до міжнародної наукометричної бази, 2 – у закордонних журналах, 13 – у тезах конференцій. За матеріалами досліджень у співавторстві видано 3 методичні розробки; отримано 1 патент на винахід.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень та їх обговорення, висновків, списку використаних джерел. Всього опрацьовано 560 найменувань, з них 252 – латинським друком. Основну частину матеріалу дисертації викладено на 304 сторінках друкованого тексту. Графічну ілюстрацію демонструють 16 рисунків; цифрову – 41 таблиця.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Роль органічних та неорганічних компонентів секретів репродуктивної системи у розвитку чоловічих гамет

Відомо, що продуцентом сперми є яєчка, епідидиміс і придаткові статеві залози. Генеративна тканина паренхіми яєчок утворює чоловічі статеві клітини, які у придатку набувають рухливості. Придаткові статеві залози – секретують спермальну плазму. Середній показник об'єму виділеного еякуляту (бугай) становить 3...5 см³. В см³ плазми міститься 1...2 млрд сперматозоїдів. Рідку частину сперми формують секрети придаткових (5...10 %), міхурцевої (40 %), передміхурової (5...6 %), Куперових і уретральних (30 %) залоз. Спермальна плазма становить 90 % об'єму еякуляту; сперматозоїди – 10 %. Склад органічних речовин, який у плазмі та сперматозоїдах представлений білками, ліпідами, вуглеводами, вітамінами й гормонами, становить 0,19 %, неорганічних – 0,75 % об'єму сперми. До складу неорганічних і органічних речовин переважно входять катіони (Ca^{2+} , K^{+} , Na^{+} , Zn^{2+} , Cu^{1-2+} , Fe^{2-4+}) та аніони солей і кислот ($\text{CH}_3\text{COO}^{-}$, OH^{-} , HCO_3^{-} , CO_3^{2-} , Cl^{-} , SO_4^{2-} , NO_3^{-} , PO_4^{3-}). Дуже незначну частину складу іонів представляють катіони P^{2-5+} , S^{2-6+} , Mg^{2+} і Mo^{6+} . Тому, з цього приводу, слід зважати на те, що дисбаланс їх концентрації у системі “середовище - клітина” має суттєвий вплив на життєздатність сперматозоїдів нативної і кріоконсервованої сперми [72, 191, 192, 243, 285, 313, 315, 457, 490].

Сперматозоїди є гаплоїдними клітинами. Їх ядерна частина містить закодовану генетичну інформацію про донора сперми. На відповідних стадіях сперматогенезу паренхіма яєчок поступово формує первинну структуру сперматозоїдів [28, 48, 50, 54, 60]. Це дуже малі за розміром (60...70 мкм), унікальні за формою, ізольовані й автономні за функціями клітини. В їх головці

міститься ядро, що має спадковий матеріал, який представлено дезоксирибонуклеїною кислотою (ДНК). Після вивільнення сперматозоїдів з яєчок у сім'япроводах відбувається резорбція аномальних клітин. Нормально сформовані (повноцінні) клітини покриваються особливою ліпопротеїною (цитоплазматичною) оболонкою ("капелькою"). Капелька поступово мігрує від апікального (краніального) краю головки до дистальної (каудальної) частини клітини, яку називають бичом або хвостом [124, 171, 175, 215, 231].

На передній частині головки знаходиться спеціальний секреторний міхурець (акросома). Об'єм акросоми заповнений гідролітичними ферментами, які дозволяють сперматозоїдам проникати в яйцеклітину. Вивільнені з акросоми ферменти ініціюють процес її запліднення. Цитоплазматична частина сперматозоїдів позбавлена рибосом і ендоплазматичної сітки. Але представлена великою кількістю щільно запакованих мітохондрій. Мітохондрії генерують енергію, яка забезпечує прямолінійний, поступальний рух клітин каналами і протоками органів статеві системи самців і самок [269, 270, 278, 287, 299, 309, 316].

Свіжоотримана нерозріджена сперма високої якості містить 80...90 % сперматозоїдів типової форми. Апікальна поверхня головки таких клітин чітко окреслена щільною (без деструктивних змін) акросомою, а шийки, тіла і хвоста – цитоплазматичною мембраною. Кількість живих сперматозоїдів у спермі становить 67...70 %, а їх рухливість – 7...9 балів. Після її розрідження, залежно від чинника впливу, число живих клітин знижується до 44...67 %; рухливість – до 6...8 балів. Чотиригодинне витримування розрідженої сперми за 37 °С зменшує кількість нормальних клітин до 27...72 %, живих – до 23...52 %; рухливість знижується до 4...7 балів. Після деконсервації гранул у 2,8 % розчині натрію цитрату (НЦ) і без нього кількість типових клітин знижується до 3...53 %, живих – до 2...41 %, рухливість – до 0...4 балів. Слід враховувати і те, що, залежно від фізіологічного стану репродуктивних органів, інтенсивності використання плідника, створеного комфорту його утримання, число

аномальних сперматозоїдів у спермі може становити 30...40 % [319, 321, 335, 356, 379].

Порушення цілісності цитоплазматичних мембран або трансмембранні дефекти (ТМД) сперматозоїдів на першому етапі ТКС призводять до того, що іони неорганічних та молекули органічних сполук дифундують з клітин в оточуюче їх середовище. Тривалість ($t = 4$ год) витримування розрідженої сперми у холодильнику за 2...4 °С сповільнює динаміку перебігу вказаного процесу. Базовим чинником захисного впливу цих обставин прийнято вважати процес седиментації (нашарування) або утворення на мембранах сперматозоїдів ліпопротеїнового шару емульсії жовтку (гіпотеза фортифікації) [24, 25, 32, 154, 199, 314, 375, 382, 458, 464, 519].

Сформульовані на даний час висновки про виявлені ТМД після розрідження й еквілібрації сперми – однозначні. Але висновки про зміни їх ядерної частини, які відбуваються внаслідок дії чинників ТКС та етапу деконсервації спермодоз у 2,8 % розчині НЦ за 37 °С – різні. Так, якщо одні автори виконаних експериментальних робіт [32, 318] стверджують, що дія наднизької температури (–196 °С) зменшує площу ядра й ініціює розпад ДНК, то інші [104, 288, 421] – це твердження заперечують.

Важливим чинником дії на сперматозоїди є також середовище каналів статевих органів самок у якому відбуваються процеси утилізації деструктивних сперматозоїдів та капаситації нормальних. В результаті, на передньому краї акросоми, утворюються спеціальні везикули (міхурці), що є ознакою гіперактивного стану сперматозоїдів. Рухаються вони лише вперед – до контакту з яйцеклітиною.

Після penetрації яйцеклітини апікальний край головки сперматозоїдів позбавляється цитоплазматичної мембрани і акросоми. Але складові внутрішньої структури клітин залишаються без змін [316, 319, 328, 351, 364, 389]. Завдяки утвореному контакту із вітеліновою оболонкою (зона пеллюціда), тільки один капаситований сперматозоїд, який забезпечує їх взаємозв'язок, – проникає у яйцеклітину. Механізм, утвореного контакту, запускають в дію

полівуглеводні комплекси, які регулюють інтенсивність переміщення Ca^{2+} , Na^+ і H^+ [390, 393, 387, 398, 415, 423].

Рідку частину сперми, або суміш секретів придатка і придаткових статевих залоз (міхурцева, передміхурова, Куперові, уретральні) та генеративних тканин яєчок, називають спермальною плазмою. Її складові компоненти, а саме: білки, ліпіди, моно-, ди- і поліуглеводи, солі органічних та неорганічних кислот формують гомеостаз середовища; створюють умови для переміщення сперматозоїдів каналами і протоками статевих органів; забезпечують оптимальну тривалість життя клітин та їх захист від шкодочинної дії екзо- і ендогенних чинників.

Важливою ознакою спермальної плазми є і те, що більшу частину вмісту секретів придатка представляють катіони солей калію, а міхурцевої, передміхурової, Куперових і уретральних – катіони солей натрію. Необхідно зауважити, що створену секретами придаткових і міхурцевої залоз рівновагу їх вмісту формують секрети сім'яних міхурців (рН 7,3) і простатевої залози (рН 6,3...6,4), які мають кислу реакцію, а передміхурової, Куперових і уретральних (рН 7,8...8,0) – лужну. В результаті, перед початком еякуляції, лужне середовище секретів сперми нейтралізує кисле, що, як сьогодні прийнято вважати, може забезпечувати перехід сперматозоїдів із пасивного (нерухомого) стану анабіозу в активний стан їх руху вперед [28, 67, 209, 457, 462, 490, 516, 529].

1.2 Гомеостаз іонів відкритих систем типу "середовище-клітина"

Застосування розріджувачів еякуляту з метою подовження часу збереження запліднювальної здатності сперматозоїдів, збільшення об'єму сперми та ефективності осіменіння тісно пов'язане з іменем І. І. Іванова [76...79], який у 1898...1904 роках довів, що сперматозоїди можуть тривалий час зберігати ознаки життя поза межами організму самця (плідника). Для цього він уперше в світі застосував монокомпонентні водні розчини солей натрію карбонату (Na_2CO_3) і сульфату (Na_2SO_4), що дозволило розпочати інтенсивний

пошук способів і засобів збереження функціональної повноцінності сперматозоїдів у спеціально створених людиною умовах. В результаті, за відносно короткий проміжок часу, вчені отримали важливі теоретичні знання, які так чи інакше пояснюють захисну і шкодочинну дію катіонів солей неорганічних сполук на стан структури й функцій ізольованих та неізольованих клітин в полікомпонентних (“фізіологічних”) розчинах Рінгера, Локка, Тіроде та їх сумішах з енергоємними і біологічно активними речовинами; створили дуже велику кількість композитних розріджувачів сперми, які сьогодні називають захисними середовищами (ЗС).

З цього приводу у 1960-тих роках В. К. Мілованов [162...169] констатував: “Пошук способів і засобів, що забезпечують виживання сперматозоїдів за екстремальних умов, проводився двома шляхами. Мета першого – полягала у тому, щоб з числа нативних речовин (молоко, мед, вершки, камедь, томатний і кокосовий сік тощо) віднайти сполуки, властивості яких сприяють тривалому збереженню життєздатності сперматозоїдів. Мета другого – передбачала створення середовищ з точно визначеним вмістом неорганічних та органічних сполук, які називають кріопротекторами”. Але, наведені напрями досліджень мали свої недоліки. Перший – не забезпечував визначення частки (ступеня) захисного впливу компонентів ЗС; другий – не пояснював їх взаємовідносин з клітиною.

Вчений також виокремив три етапи розвитку штучного осіменіння. Базовим завданням першого етапу було збільшення об’єму нативної сперми. Тому ЗС, до складу яких ввели солі хімічних сполук, назвали екстендорами або розріджувачами.

Завданням другого – став пошук оптимальних умов, які б забезпечували збереження життєздатності сперматозоїдів. Для подовження часу виживання клітин у діапазоні 18...24 °С використали розчини вуглеводів. При тривалому зберіганні розрідженої сперми за 2...4 °С шкодочинну дію осмотичного і холодового “шоку” зменшили сумішами розчинів вуглеводів та емульсії жовтку курячого яйця. Для захисту сперматозоїдів від дії наднизької температури (–196

°C) і змін градієнту концентрацій у відкритих системах типу “середовище - клітина” створили полікомпонентні ЗС. До складу ЗС ввели гліцерин, моно-, ди- і полівуглеводи, солі макро- і мікроелементів, жовток з його складовими.

Завдання третього етапу виконаних досліджень полягало в активізації локального впливу біологічно активних речовин на статеві органи самок. До складу ЗС додатково ввели ферменти і гормони, або імплеметори. Однак, не зважаючи на те, що кількість складових для створення нових середовищ зростала дуже швидко, результат їх захисного впливу на клітину залишився на рівні 30...60-тих років XX століття. Наведені аргументи означають, що вчені ще до тепер не зуміли розробити виразну, аргументовану й ефективну теорію захисту ізольованих (сперматозоїди, клітини крові) та неізольованих клітин організму людини і тварин, застосування положень і правил якої дозволило б досягти максимально можливого рівня збереження повноцінності їх структури й функцій.

Перші повідомлення про наявність іонів лужних металів у спермі пов'язують з іменем швейцарського вченого Ф. Мішера, який у 1892 році виявив у молоках лосося 0,19 % вмісту органічних та 0,75 % вмісту неорганічних речовин. Визначене у золі, спалених ним проб, співвідношення концентрації $\text{Na}^+:\text{K}^+$ становило 4:1. F. Miescher [171] тоді писав: “Беручи до уваги такий склад рідини можна не сумніватися у тому, що неорганічна частина сперми має виконувати певну роль, а саме: служити для того, щоб, подібно до дії “фізіологічного” розчину кухонної солі (NaCl), надати сперматозоїдам, необхідну при вивільненні з яєчок, рухливість. Це не супроводжується якими-небудь пошкодженнями і досягається завдяки ізотонічним властивостям рідини”.

Але, на противагу твердженню Ф. Мішера про ізотонічність спермальної плазми, російський вчений О. Бернштейн [17, 18] у 1933 році висловив іншу думку (табл. 1.1). Він акцентує увагу на тому, що рідина, яка оточує сперматозоїди у статевих органах до і після еякуляції сперми, суттєво відрізняється за показниками концентрації й відношень найбільш важливих

катіонів від ізотонічних розчинів. О. Бернштейн вважає, що властива іншим клітинам і тканинам організму людини і тварин ізотонічність їх рідин не може бути нормою для сперматозоїдів. Наведену тезу вчений вивів з отриманих відхилень визначених показників концентрації іонів у спермі. Сперматозоїди, за різних осмотично активних умов, зберігають високу адаптивну здатність до змін концентрації іонів у відкритих системах типу “середовище - клітина”. Висновок О. Бернштейна вказує на те, що викладені аргументи мають дуже важливе значення для досліджень, кінцева мета яких спрямована на пошук ефективних розріджувачів сперми.

Таблиця 1.1.

Ліміти концентрації іонів лужних металів (М, мМ)

Роки публікацій	Об'єкти досліджень	Концентрація		
		Ca ²⁺	K ⁺	Na ⁺
1933 – 1993	сперма	5...19	35...255	33...330
1997 – 2014	НKK*	7...11	16...33	93...123
	СКК*	3...11	25...46	64...97
	ВKK*	4...12	32...69	61...87
1933 – 1993	сп. плазма	6...12	35...76	49...124
1997 – 2014	НKK	5...10	12...23	68...107
	СКК	2...9	21...31	47...82
	ВKK	3...9	26...54	48...69
1954 – 1983	сперматозоїди	2...4	10...62	33...75
1997 – 2014	НKK	1...2	2...10	11...27
	СКК	1...2	3...15	13...21
	ВKK	1...2	6...19	12...18

Примітка. *НKK – низька, *СКК – середня, *ВKK – висока концентрація калію. (1933 – 1993 pp.) – Бернштейн (1933), Несмеянова (1936), Канцедал (1971), Семаков (1976), Orgi (1983), Bidot (1992), Кононов (1993); (1954 – 1983 pp.) – Rotschild (1954), Канцедал (1971), Abou-Shakra (1989); Зверєва, Максим'юк (1997 – 2000), Максим'юк, Воробець (1998 – 2014).

Проведене нами узагальнення [128], визначених [20, 55, 72, 102, 196, 233, 243, 305, 334] у 60...90-тих роках параметрів концентрації Ca²⁺, K⁺, Na⁺, свідчить, що її ліміти у спермі – різні. Межа відхилень (min...max) концентрації Ca²⁺ становить 5...19, K⁺ – 35...255, Na⁺ – 33...300 мМ. Межа відношень концентрації Na⁺:Ca²⁺ становить 7...17:1, K⁺:Ca²⁺ – 7...13:1, K⁺:Na⁺ – 1:1. З

цього приводу відомі, авторитетні джерела, а саме: Т. Н. Несмеянова [191, 192], L. Rotshild [486, 487], R. Aitken [319...321] стверджують, що K^+ у сперму поступає з секретами, які продукує паренхіма яєчок; Na^+ – з секретами, які синтезує паренхіма придаткових залоз. Це означає, що сформовані статеві клітини переміщуються із середовища з високою концентрацією K^+ (яєчко) у середовище з високою концентрацією Na^+ (сім'япрвід).

Результати наведених досліджень розширила і доповнила Г. С. Лісовенко [121]. Автор виконаної роботи вказує на те, що секрети тканин яєчка багаті катіонами (K^+ і Na^+) та аніонами (Cl^-). Параметри концентрації K^+ у паренхімі яєчка переважають параметри Na^+ . Межа її відношень між іонами різнойменної пари $Na^+:K^+$ – дуже широка 1...8:1.

Узагальнені з цього приводу висновки В. О. Наука [176...187] співпадають з результатами попередніх досліджень. Наведені дослідником дані свідчать, що концентрація іонів лужних металів у різних ділянках придатка яєчка – різна, а саме: у тканинах головки (caput) вища, ніж у середній (corpus) і кінцевій (cauda) частинах.

У клітинах тканин і органів статеві системи людини і тварин концентрація Na^+ і K^+ також різна [72, 102]. За даними [191, 192, 241, 243, 333, 398, 430] її співвідношення у спермі може бути більшим, або меншим за одиницю (табл. 1.2). З цього приводу наголошується на тому, що концентрація іонів макроелементів у спермі впродовж багатьох років має відносну індивідуальну стабільність [48, 255], а визначені незначні відхилення граничних показників від середніх значень пов'язані зі змінами температури навколишнього середовища у різні пори року. Встановлено також, що рівень концентрації K^+ і Na^+ у спермі впливає на заплідненість корів [87, 88, 256, 261...263]. Якщо співвідношення $Na^+:K^+$ становить 1:1, то їх заплідненість після першого осіменіння – низька (34 %), а якщо 3:1, то в 2 рази вища (74 %).

Дані L. Rotschild [486, 487] і S. Gur [405] свідчать, що концентрація K^+ у сперматозоїдах вища, ніж Na^+ . Вчені наголошують на існуванні оберненого зв'язку між концентраціями K^+ та Na^+ ; прямого – між концентраціями K^+ та

Ca^{2+} і припускають, що контроверзність рівнів концентрації K^+ і Na^+ пов'язана з інтенсивністю обміну у сперматозоїдах енергоємних органічних речовин. Однак, В. І. Канцедал [86...88] доводить, що концентрація K^+ у спермальній плазмі вища, ніж Na^+ . Тому співвідношення $\text{K}^+:\text{Na}^+$ у спермальній плазмі становить 3:1, а у сперматозоїдах – 1:1.

Таблиця 1.2.

Ліміти відношень концентрації між парами іонів лужних металів (М, ч.в.)

Роки публікацій	Об'єкти досліджень	Співвідношення різно- та однойменних пар					
		$\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$	$\text{K}^+:\text{Ca}^{2+}$	$\text{Na}^+:\text{K}^+$	$\text{Ca}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$	$\text{K}^+:\text{K}^+$	$\text{Na}^+:\text{Na}^+$
1933...1993	сперма	7...17:1	7...13:1	1:1	—	—	—
1997...2014	НKK*	11...13:1	2...3:1	4...6:1	—	—	—
	СКК*	9...21:1	4...8:1	2...3:1	—	—	—
	ВKK*	7...15:1	6...8:1	1...2:1	—	—	—
1933...1993	сп. плазма	8...10:1	6:1	1...2:1	—	—	—
1997...2014	НKK	11...14:1	2:1	5...6:1	—	—	—
	СКК	9...24:1	3...11:1	2...3:1	—	—	—
	ВKK	8...16:1	9...6:1	1...2:1	—	—	—
1954...1971	сперматозоїди	17...19:1	5...16:1	1...3:1	—	—	—
1997...2014	НKK	11...14:1	2...5:1	3...6:1	—	—	—
	СКК	11...13:1	3...8:1	1...4:1	—	—	—
	ВKK	9...12:1	6...10:1	1...2:1	—	—	—
1933...1993	сп. плазма: сперматозоїди	25...31:1	18...19:1	2...5:1	3:1	1...4:1	1...2:1
1997...2014	НKK	11...14:1	2...5:1	3...6:1	5:1	2...6:1	4...6:1
	СКК	11...13:1	3...8:1	1...4:1	2...5:1	2...7:1	4:1
	ВKK	9...12:1	6...10:1	1...2:1	3...5:1	3...4:1	4:1

Примітка. *НKK – низька, *СКК – середня, *ВKK – висока концентрація калію.

Неоднозначними й суперечливими є результати досліджень місця локалізації активних форм іонів та інтерпретація їх ролі у збереженні функціональної повноцінності сперматозоїдів. Так, якщо І. Aranha [325],

М. Rossato [485], S. Kilik [378], O. Magnus [425], B. Sheppard [536] однострійно стверджують, що сконцентровані під екваторіальним сегментом акросоми катіони Ca^{2+} стимулюють інтенсивність руху сперматозоїдів, то С. Г. Жабін [89] і S. Pesch [468] такої дії не виявили.

Зміни, зареєстрованої у системах типу “середовище - клітина” рівноваги вмісту K^+ і Na^+ , приводять до того, що процеси активного транспорту й полегшеної дифузії іонів створюють оптимальні умови для переміщення у клітину пластичних та енергетичних ресурсів. Співвідношення переміщеного вмісту неорганічних і органічних сполук – однакове і становить 1:1. Але, оскільки K^+ слабше зв’язується з водою, ніж Na^+ , то швидкість переміщення складових більше залежить від концентрації K^+ . Процес “входу - виходу” іонів забезпечує антипортний спосіб руху K^+ щодо Na^+ . Інтенсивність їх руху регулює рівень концентрації Ca^{2+} [123, 285, 481, 504, 525, 539].

На даний час вчені ще не визначилися щодо вектору руху іонів у системі “середовище - клітина”. Якщо В. П. Кононов [99...102] стверджує, що після витримування ($t = 4$ год) сперми у холодильнику за $2...4$ °C співвідношення концентрації $\text{Na}^+:\text{K}^+$ залишається сталим, то В. С. Семаков [258] – доводить протилежне. Уже після розрідження свіжоотриманої сперми лактозо-жовтково-гліцериновим ЗС сперматозоїди втрачають 66 % вмісту Na^+ ; 62 % – K^+ і 42 % – Ca^{2+} . На етапах еквілібрації розрідженої сперми та деконсервації заморожених гранул процес переміщення іонів у системі “середовище - клітина” продовжує відбуватися. За даними В. О. Наука [176...187], після розрідження (37 °C), еквілібрації ($2...4$ °C) й деконсервації (37 °C) сперми, у сперматозоїдах зростає концентрація Na^+ , але знижується – K^+ . Наведене означає, що проблему нестабільності вмісту іонів у спермі плідників ще не до кінця зрозуміли і не розв’язали. Отже, для того, щоб виразно сформулювати необхідні для її розв’язку постулати, варто отримати об’єктивні дані про вірогідні причини появи аномальних і деструктивних форм сперматозоїдів та до деталей вивчити особливості перебігу адаптивної “реакції - відповіді” живих нормальних клітин на дію екзо- і ендогенних чинників [28, 41, 268, 278, 319...321, 363, 414].

З цього приводу R. Handrow [408], A. Simpson [503], K. Ashizawa [328] стверджують, що за прямої дії екзогенних чинників внутрішньоклітинний Ca^{2+} переміщається в оточуюче клітину середовище. Але L. Robertson [481], G. De Blas [525], В. П. Кононов [99...102] – дотримуються протилежної точки зору. Результати досліджень цих вчених свідчать: різними є не лише показники, які визначають вектор руху іонів, але і показники, які впливають на рухливість та запліднювальну здатність сперматозоїдів. S. Arver [327] і M. Vierula [539] стверджують, що Ca^{2+} стимулює рухливість клітин. Однак П. С. Попов [237] такого впливу не виявив. К. Ashizawa [328] доводить, що введення Ca^{2+} в оточуюче клітину середовище відновлює рух інтактних сперматозоїдів. Це дозволило йому зробити висновок, що стимуляція рухливості сперматозоїдів опосередкована дією ферментів, які зв'язані із компонентами їх акросоми й цитоплазматичної мембрани.

Таким чином, наведені нами аргументи означають, що проблема збереження життєздатності сперматозоїдів за дії екстремальних чинників ТКС залишається актуальною ще до цього часу. Тому, оскільки оцінювання ступеня захисного впливу моно- і полікомпонентних ЗС на повноцінність екзоструктури й функцій сперматозоїдів кріоконсервованої сперми залежить від об'єктивності одержаних результатів досліджень, то дослідникам вказаної проблеми, з метою її ефективного розв'язку, пропонуємо комплекс розроблених, модифікованих, стандартизованих, адаптованих в аналітичну дослідну і практичну роботу методик [145, 146, 152, 161], реалізація яких не потребує особливих зусиль і коштів.

1.3 Вплив біохімічних процесів на розвиток трансмембранних дефектів сперматозоїдів за дії етапів технології кріоконсервації сперми

Опубліковані в науковій літературі результати досліджень сучасних вчених ілюструє визначена нестабільність показників концентрації, рухливості, структури й функціональної повноцінності сперматозоїдів; об'єму еякулятів та вмісту у них ферментів, гормонів, вуглеводів, ліпідів, солей макро- і

мікроелементів. Вчені вважають, що причиною розбіжності даних з одного боку є дія на організм плідника та сперму умов зовнішнього середовища (сезон парування, годівля, утримання, статеве навантаження, чинники етапів ТКС), з іншого – індивідуальних, генетично зумовлених ознак [49, 255, 262, 263, 330, 357, 366, 492].

Пошук способів і засобів, які допоможуть звести до мінімуму негативну дію чинників ТКС, розпочали з оцінки ступеня змін життєздатності сперматозоїдів. Дуже швидко встановили, що їх функціональна повноцінність тісно пов'язана з адаптивною реакцією клітин на дію екзо- та ендогенних чинників [262, 376, 379, 381, 437, 493, 494, 555]. Тому уже виконані дослідження аналізуємо з позиції отриманих висновків про вивчені особливості ТМД за дії чинників етапів ТКС.

Окремі вчені вважають, що розрідження сперми не впливає на структуру сперматозоїдів. Але при цьому зазначають, що визначений у свіжоотриманих і розріджених еякулятах відсоток клітин з незміненою структурою акросоми та цитоплазматичної мембрани головки, шийки, тіла і хвоста становить 71...73 % [23, 71, 74, 172, 174, 175].

Індиферентну дію етапу розрідження сперми на функціональний стан клітин підтримують Е. Kirk [432] і А. П. Кругляк [112...115], які пояснюють механізм захисної дії розріджувачів перебудовою структури білкових макромолекул у мембранах, що підвищує їх стійкість до дії чинників ТКС.

Нейтральну і позитивну точки зору на вказану проблему заперечують автори роботи [458]. Їх висновки діаметрально протилежні до попередніх. Залежно від параметрів концентрації кріопротекторів та їх фізичних і хімічних властивостей, ступінь деструкції мембран одразу ж після розрідження свіжоотриманої сперми може становити 16...59 %. Дану позицію підтримують В. А. Наук [184, 186] і J. Bailey [331].

Негативний вплив чинників першого етапу ТКС на стан структури й функцій сперматозоїдів виявили вчені, які стверджують, що після розрідження сперми 8...40 % сперматозоїдів зазнають деструктивних змін. Порушення

цілісності мембран приводить до того, що з клітин в оточуюче середовище дифундують іони неорганічних та молекули органічних сполук. В результаті сперматозоїди втрачають, запрограмовану на генному рівні, початкову, сформовану організмом самця їх природну здатність до руху, penetрації й запліднення яйцеклітин [15, 24...27, 70, 188, 234, 238, 265, 283, 284, 303, 380, 432].

Цієї ж точки зору дотримується автор роботи [543], який вважає, що зміна показників рН та осмотичного тиску спермальної плазми і штучно створених ЗС негативно діє на екзоструктуру сперматозоїдів, що знижує їх рухливість. При цьому незначні відхилення параметрів концентрації кріопротекторів від ізотонії створюють умови, за яких відбувається суттєва деградація цитоплазматичної мембрани хвоста. Але деструктивні зміни акросоми, шийки і тіла сперматозоїдів виражені значно слабше.

Негативний вплив чинників етапу еквілібрації розрідженої сперми на стан екзоструктури статевих клітин ілюструють висновки робіт Г. В. Зверєвої [71...73]. Встановлено, що на даному етапі ТКС ТМД екзоструктури сперматозоїдів нарастають. Встановлене підтверджують результати досліджень [32, 74, 116, 117, 125, 188, 296, 303, 323, 438, 444, 460]. Однак, визначений ступінь деградації клітин, вчені різних наукових шкіл пояснюють з різних точок зору.

Так, И. И. Катков, [94], И. В. Смирнов [265...267], И. И. Иванов [76...79], I. Yong, [558], B. Keel, [431], M. Tamuri [520] запевняють, що зміна первинного стану структури акросоми та цитоплазматичної мембрани головки і шийки, крім тіла і хвоста, починається одразу ж після розрідження сперми. Це негативно діє на рухливість і запліднювальну здатність сперматозоїдів. Тому В. А. Наук [185, 186] і А. П. Кругляк [112...115] пропонують або виключити вказаний етап з технологічного процесу, або скоротити його до 10 секунд. Але інші [27, 37, 70, 154, 234, 246...248, 288, 350, 375, 440] доводять, що оптимальний проміжок часу еквілібрації розрідженої сперми за 2...5 °С має становити 3...4 год. За цей час показники ТМД, рухливості й запліднювальної

здатності сперматозоїдів не зазнають змін, а стійкість цитоплазматичної мембрани до негативної дії наднизьких температур – зростає.

Процеси, що відбуваються на етапі деконсервації сперми, вивчено з різних сторін і досить детально. Вчені вважають, що 2,8 % розчин натрію цитрату, який використовують для деконсервації спермодоз, несуттєво впливає на стан структури й функцій сперматозоїдів. Якщо до розчину ввести глутатіон, то рухливість деконсервованих сперматозоїдів підвищується. Але при цьому слід враховувати те, що цитоплазматична мембрана сперматозоїдів окремих плідників має різну ступінь стійкості [23, 70, 175, 264, 299, 433, 530].

Особливістю третього етапу ТКС є те, що він має дві технологічні стадії. Першу стадію характеризує дія наднизької (-196°C) температури рідкого азоту, другу – дія чинників деконсервації спермодоз у 2,8 % розчині натрію цитрату за 37°C . Здійснювати ефективний контроль за станом структури й функцій сперматозоїдів на першій стадії третього етапу ТКС дуже складно. Тому обґрунтовані механізми її деструктивного впливу здебільшого гіпотетичні. Вчені припускають, що процес кристалізації води підвищує рівень концентрації катіонів і аніонів у позаклітинному просторі. Це обезводнює сперматозоїди, підвищує осмотичний тиск середовища, а утворені сольові кристали льоду здійснюють на клітину механічний тиск [411, 421, 427, 432, 519, 528, 541, 542...544, 556]. Аби позбутися шкодочинного тиску кристалів на клітину, за рахунок їх переходу у рідкий, склоподібний або вітрифікований стан, кріоконсервацію сперми і деконсервацію спермодоз рекомендують проводити дуже швидко [16, 26, 214, 247].

Залежно від, рекомендованих різними науковими школами, чинників етапів ТКС після деконсервації спермодоз виживає лише 5...30 % сперматозоїдів. Їх запліднювальна здатність становить 50...60 % [81, 118...120, 122, 160, 186, 188, 286, 362, 382]. Окремі вчені підвищують число життєздатних клітин до 40...50 %. Але стверджують, що лише 10...15 % з них зберігають запліднювальну здатність і живуть дуже короткий проміжок часу [185, 460, 519, 542].

Оптимальними параметрами чинників вважають ізоосмотичні сольові розчини за температури 35...40 °С [117, 238, 303, 311, 375, 458, 543]. Однак І. В. Смірнов [265...267], В. Киреева [96], J. Foulkes [391], Н. Rodriguez-Martiner [482], А. П. Кругляк [112...115] пропонують застосовувати високо-температурний (40...190 °С), надшвидкий (8...25 с) спосіб деконсервації спермодоз з кінцевою інкубацією сперматозоїдів у водяній бані за 35...37 °С. Вчені запевняють, що вказані чинники впливу не суттєво змінюють стан структури й функціональної повноцінності сперматозоїдів.

Індикатором запліднювальної здатності сперматозоїдів може бути стан структури ядра, а саме: якщо 2 % його вмісту знаходяться у вигляді гранул, то запліднюваність самок є дуже низькою [533]. Слід зважати на те, що зміна екзоструктури клітин, яку супроводжують різні способи переміщення органічних та неорганічних речовин у системі “середовище - клітина”, не є особливо важливим чинником дії для збереження їх запліднювальної здатності. Незалежно від того, що у сперматозоїдах відбувається зниження концентрації амінокислот, нещільно зв’язаного холестерину, іонів солей макро- і мікроелементів, активності ферментів; сповільнюється процес поглинання кисню; збільшується число окиснених –SH– груп; прискорюється розпад плазматичних білків; зростають показники активності фруктолізу і концентрації малонового альдегіду, а рівень концентрації ДНК у ядрі статеві клітини – залишається без змін [368, 411, 464, 528, 542].

Особливості змін функціонального стану сперматозоїдів вивчено доволі детально і з різних сторін. Вчені майже одностайно сходяться на тому, що розрідження сперми за 25...37 °С викликає незначні зміни. Однак, відхилення температури від наведених параметрів приводить до гідролізу АТФ, що знижує інтенсивність поглинання кисню [32, 104, 382]. Зменшується активність руху сперматозоїдів, яка може відновитися лише через відповідний проміжок часу [389].

Зміни структури сперматозоїдів ініціюють зміни їх функціонального стану. Статеві клітини не утилізують кисень [64, 160, 280], втрачають здатність

до акросомної реакції [89, 95], знижується активність ферментів [244, 336]. Активна дія кріопротекторів на клітину індукує переміщення плазматичних білків і амінокислот у системі “середовище - клітина” [248, 339].

Порушені біохімічні та біофізичні механізми збереження функціональної повноцінності клітин призводять до деструкції акросоми й цитоплазматичної мембрани. Зміни структури й функцій сперматозоїдів відбуваються на молекулярному рівні, а саме: 58 % вмісту фосфатидилгліцерину переміщається із внутрішнього шару мембран у зовнішній [44, 45, 156, 157]. Ступінь деструкції їх первинного стану може становити 9...27 % [75, 294, 433]. В результаті активізується перебіг перекисних процесів у сперматозоїдах, що збільшує концентрацію вільних радикалів у спермі [194, 280, 295].

Однак, незалежно від того, що впроваджені у ТКС осмотичні та температурні параметри умов розрідження сперми вважають оптимальними, негативний вплив ЗС на сперматозоїди – значний. У розрідженій спермі в 2...3 рази вищим стає рівень утилізації кисню [323, 520]. Енергетичний обмін поживних речовин переходить з білкового на вуглеводний, тому вміст амінокислот у спермі зменшується на 300 % [11]. Високоактивні ферменти мембран сперматозоїдів дифундують в оточуюче клітину середовище [10, 15, 20, 21, 348]. У сперматозоїдах збільшується концентрація АТФ і зменшується концентрація фосфору [108, 405, 452]. Знижується природна резистентність мембран клітин до дії екзогенних чинників. На 25...30 % зменшується кількість сперматозоїдів, які здатні запліднити яйцеклітину [29, 61...66, 111, 292, 474, 520].

Другий етап ТКС прийнято розглядати як результат впливу чинників етапу розрідження сперми або особливостей адаптивної реакції сперматозоїдів на вказану дію. Тому активність деструктивного впливу процесів, що відбуваються у системі “середовище - клітина” після розрідження сперми, оцінюють процесами вирівнювання концентрації розчинених речовин з обох сторін цитоплазматичної мембрани та адаптації сперматозоїдів до дії чинників другого етапу ТКС.

Обов'язково слід враховувати те, що вказані процеси регулюються пасивною різноспрямованою дифузією органічних та неорганічних речовин. Інтенсивність її перебігу є причиною незворотніх ТМД сперматозоїдів. Чотиригодинне витримання розрідженої сперми у холодильнику за 2...4 °С сповільнює інтенсивність перебігу деструктивних процесів. Тому захисну дію чинників вказаного етапу ТКС пояснюють нашаруванням на поверхні сперматозоїдів ліпопротеїнів емульсії жовтку [16, 24, 61, 204, 355].

Якщо негативна дія чинників ТКС на екзоструктуру сперматозоїдів без сумніву має місце, то висновки вчених на ендоструктуру клітин – різні. В. П. Кононов [101] стверджує, що дія наднизької температури ініціює розпад ядерної ДНК і зменшує площу головки сперматозоїдів, але В. К. Мілованов [165, 166] і Т. Kiyotaka [433] – категорично заперечують наведений висновок.

Негативну дію екзогенних чинників на сперматозоїди A.Ruscudin [489], A. Simpson [503] і К. Ashizawa [328] пов'язують із переміщенням Ca^{2+} з клітин в оточуюче їх середовище, але L. Robertson [481], R. Zhou [352] і В. Кононов [124] стверджують, що за таких обставин Ca^{2+} із середовища проникає у клітини. Тому, оскільки висока концентрація Ca^{2+} стимулює розпад АТФ і супроводжує денатурацію білків, то можна очікувати, що і висока, і низька концентрація Ca^{2+} знижує рівень запліднювальної здатності сперматозоїдів [55, 58, 123, 451, 489].

Неоднозначними і суперечливими є висновки вчених щодо параметрів концентрації та способів переміщення іонів лужних металів у системі “середовище - клітина”. Особливості переміщення Ca^{2+} у сперматозоїди ілюструють дослідження С. Лобченко [123]. В період еквілібрації вектор руху Ca^{2+} у клітину не змінюється. Після деконсервації спермодоз 35 % вмісту вільного Ca^{2+} дифундує із кріозахисного середовища у сперматозоїди. Однак, В. Семаков [258], В. А. Наук [184] і Я. Профіров [243] не виявили суттєвих змін концентрації Ca^{2+} у середовищі та сперматозоїдах, а L. Fraser [394] стверджує, що уже після еквілібрації розрідженої сперми концентрація Ca^{2+} у сперматозоїдах зростає в 2 рази.

За прямої дії екзогенних чинників на клітину переміщення Ca^{2+} з клітин в оточуюче середовище зареєстрував А. Ritar [480], але R. Petzoldt [469] – з середовища у клітину. З цього приводу слід наголосити на тому, що різними є не лише показники, які ілюструють спрямованість вектора руху іонів у системі “середовище - клітина”, але і показники, які вказують на зв’язок концентрації іонів із збереженням рухливості та запліднювальної здатності сперматозоїдів.

Зокрема, якщо S. Kilic [378] і G. Wishart [556] стверджують, що Ca^{2+} стимулює рухливість сперматозоїдів, то П. С. Попов [237] і S. Prien [496] такого впливу не виявили, а K. Ashizawa [328] доводить: внесення Ca^{2+} у ЗС відновлює рухливість інтактних сперматозоїдів. Звідси випливає, що стимуляція рухливості статевих клітин може бути опосередкована дією ферментів. Отже, ефективність стимулюючого та інгібуючого впливу ферментів на інтенсивність руху сперматозоїдів залежить від особливостей зв’язку їх активних центрів з активаторами біохімічних реакцій.

Після дії чинників етапів розрідження, еквілібрації та деконсервації сперми виявлено антипортне переміщення Na^+ щодо K^+ , а саме: рівень концентрації Na^+ у сперматозоїдах збільшується; K^+ – зменшується. Вказаний спосіб переміщення іонів змінює у системі “середовище - клітина” гомеостаз Na^+ і K^+ , знижує цілісність мембран сперматозоїдів, підвищує їх проникність [313]. Але, експериментальне моделювання дії “холодового шоку” на клітину показало, що різке зниження температури ЗС з 40 до 0 °C ініціює одночасний симпортний вихід Ca^{2+} , Na^+ і K^+ із сперматозоїдів у ЗС [471].

За умов кріоконсервації сперми дисоційовані катіони органічних та неорганічних солей нейтралізують акумульований поверхнею клітин від’ємний електричний заряд; посилюють фруктоліз і гальмують ферментативні процеси; захищають клітину від шкодочинної дії “холодового шоку”; стабілізують стан білковоліпоїдних комплексів; створюють буферність і визначають температуру кристалізації ЗС [108, 243, 274, 285, 394, 468, 481, 485, 499, 525].

З дещо інших позицій, ніж наведені нами висновки, слід аналізувати дослідження, що вказують на наявність зв’язку показників якості сперми з

індивідуальними ознаками самців. В еякулятах окремих плідників виявлено сперматозоїди або з низькою, або з високою запліднювальною здатністю [48, 49, 255, 261, 308, 357, 437, 492]. Стверджують також, що рівень концентрації іонів лужних металів у спермі плідників впродовж багатьох років є відносно стабільною величиною. Визначені незначні відхилення від її середніх значень пов'язують з неоднаковим температурним режимом тої чи іншої пори року [256, 262, 366].

У різні періоди парувального сезону показники рухливості, концентрації й запліднювальної здатності сперматозоїдів усіх видів тварин – неоднакові [259, 263, 330, 376, 379, 381, 463, 494, 555].

Зміну параметрів наведених показників пов'язують із різною активністю ферментів, що дифундують з клітин у спермальну плазму [189, 190, 197, 323, 339, 342, 398]. Виявлені розбіжності даних встановлені для титру аглютинації антитіл [19, 85]; концентрації статевих гормонів у крові [376]; концентрації ліпідів і фосфоліпідів у сперматозоїдах [280]; кількості та спектру мікробних тіл у спермі [297].

Зареєстровано негативну дію екзогенних чинників на відношення кількості сперматозоїдів з їх нормальною і деструктивною мембраною [28, 40, 48, 50, 124, 215, 529] та на формування структури клітин при дії ендогенних чинників за різних стадій сперматогенезу. Найменшу кількість сперматозоїдів із зміненою структурою (10...20 %) виявили в еякулятах, які отримують на початку та у середині сезону парування тварин. Але із затуханням статевої активності їх число може зростати до 40...50 % [557].

Не зважаючи на те, що шкодочинну дію умов зовнішнього середовища на якість сперми визнає більшість вчених, у роботах окремих дослідників її не виявлено. Вчені [261, 379], стверджують, що якість сперми клінічно здорових плідників у різні періоди парувального сезону є однаковою. У спермі високої якості зареєстровано стабільно однакові показники відношень нормальних і аномальних форм сперматозоїдів [529], їх біометрії [215] та концентрації Ca^{2+} [485, 512] і pH [90].

Найбільш дослідженою у віковому аспекті є сперма бугаїв, використовувати яких для одержання сперми до досягнення одnorічного віку не рекомендують. Число деструктивних сперматозоїдів в еякулятах молодих бугайців може досягати 65 %. При цьому 35 % клітин з нормальною структурою не витримують умов їх заморожування до -196°C [307, 308]. Тому до експлуатації допускають бугаїв лише з 14...18-місячного віку [255, 371, 383]. В еякулятах вказаної вікової групи нормалізуються показники концентрації вуглеводів, білків, ліпідів, гормонів та мінеральних речовин [458, 519, 557]. До 17 % зменшується число деструктивних форм сперматозоїдів [433].

Свіжоотримані нерозріджені еякуляти плідників зрілого віку в середньому містять 80...90 % сперматозоїдів типової форми [50, 54, 174, 363, 529]. Але, залежно від функціонального стану репродуктивних органів, інтенсивності статевого навантаження на плідника, число аномальних клітин у спермі може зростати до 30...40 % [60, 278, 287, 319, 335, 414].

Бугаї цієї вікової групи зберігають нормальну запліднювальну здатність сперматозоїдів за умови, якщо кількість деструктивних клітин у свіжоотриманих еякулятах становить 8...13 % [175, 240...243, 299], а показники якості нормальних (рухливість і тривалість виживання за 37°C) – стабільно однакові [213, 264, 269, 328]. Оптимальними є також показники концентрації каротину, фосфору, окисненого й відновленого глутатіону, активності аміотрасфераз, кислої і лужної фосфатаз [244, 280, 335, 364, 374, 409, 468, 484].

Після досягнення бугаями 10-річного віку фізіологічний процес затухання їх статевої активності збільшує кількість аномальних сперматозоїдів у спермі до 40...50 % [49]. Знижується концентрація фруктози [321, 380, 430, 460], зменшується об'єм виділеного еякуляту, знижується концентрація, рухливість, запліднювальна здатність та кріорезистентність сперматозоїдів [124, 282, 291, 397].

Зміна показників якості сперми залежить від інтенсивності статевого навантаження плідників. Тому його оптимальним режимом вважають забір два

рази на тиждень дуплетних еякулятів. Одноразовий забір – недостатній; триразовий – шкідливий.

Триразовий режим одержання дуплетних еякулятів зменшує об'єм спермальної плазми, знижує концентрацію і рухливість сперматозоїдів; збільшує кількість аномальних і мертвих клітин у спермі. У крові плідників підвищується концентрація каротиноїдів та вітамінів А і Е [486, 500].

В. А. Яблонський [307] вважає, що активний моціон позитивно впливає на функціональний стан організму плідника; не змінює об'єму еякулятів та рухливості сперматозоїдів у них. Але незбалансований рівень годівлі призводить до ожиріння плідників. Знижується резистентність їх організму та спермопродуктивність.

Окремі вчені [260, 261, 500] вважають, що на якість сперми впливає порода тварин. Різні породи характеризують неоднакові показники об'єму еякулятів і концентрації сперматозоїдів у них [125], вмісту і активності біологічно активних речовин у спермальній плазмі та сперматозоїдах [323, 342, 482], кількості аномальних сперматозоїдів в еякулятах та їх біометрії [462, 515]. Але В. Р. Чавес [298] і А. Рустенов [255] такого впливу не виявили. А. D'Alessandro [366] вважає, що показники концентрації органічних та неорганічних речовин у спермі плідників різних порід – стабільно однакові.

Отже результати проаналізованих досліджень свідчать, що індивідуальні особливості плідників та ТМД сперматозоїдів за дії чинників етапів розрідження, еквілібрації й деконсервації сперми призводять до втрат їх життєздатності та запліднювальної здатності. Тому, для ефективного розв'язку даної проблеми, з нашої точки зору, необхідно з'ясувати природу і особливості контроверзності рівнів концентрації іонів, розробити ефективні способи оптимізації негативного впливу чинників ТКС, ідентифікувати причини появи аномальних, деструктивних і функціонально неповноцінних сперматозоїдів, заручитися об'єктивними знаннями про особливості дії екзо- і ендогенних чинників на клітину та на перебіг біофізичних і біохімічних процесів у системі “середовище - клітина”.

1.4 Механізм дії кріопротекторів на стан структури й функцій статевих клітин

Спосіб визначення параметрів захисної дії кріопротекторів на сперматозоїди обґрунтований відомою тезою: розріджувати свіжоотриманий нативний еякулят необхідно середовищем, концентрація розчинених речовин якого ізотонічна, а осмотичний тиск і рН – співпадають з спермою. Слід враховувати і те, що органічні та неорганічні речовини знижують температуру замерзання сперми на $-0,6^{\circ}\text{C}$.

Оскільки солі електролітів у водному середовищі дисоціюють на іони, то ізотонічність електролітів визначають точкою замерзання, яка для одномолярних розчинів становить $-1,85^{\circ}\text{C}$. Це в 3 рази менше, ніж у спермі. Тому для приготування ізотонічного розчину треба $1/3$ маси молекули електроліту поділити на кількість продисоційованих іонів, а масу молекули неелектроліту – на число 3.

Для перевірки захисних властивостей кріопротекторів готують біологічну пробу, або ряди моно- чи полікомпонентних ЗС. Параметри концентрації кріопротекторів повинні мати лише незначні відхилення від ізотонії. Оптимальними вважають відхилення (min...max), що забезпечують найвищу тривалість виживання сперматозоїдів за 37°C [162, 165, 167].

Відомі і більш складні схеми вивчення особливостей впливу кріопротекторів на життєздатність сперматозоїдів. Для двокомпонентних ЗС використовують методику арифметичних та геометричних рядів; для трикомпонентних – методику рівностороннього трикутника [169, 207, 283, 284]. Однак скомпоновані за цими методиками ЗС створюють умови за яких виживає лише 30...40 % функціонально повноцінних сперматозоїдів. Тому для того, щоб продовжити тривалість виживання деконсервованих сперматозоїдів та зменшити шкодочинну дію кріопротекторів на стан структури й функцій клітин слід до деталей знати особливості змін гомеостазу іонів неорганічних та молекул органічних речовин у системі “середовище - клітина”.

Накопичення гліцерину у клітинах рослин за дії низьких температур у 1912...1913 роках ХІХ століття виявив російський ботанік Н. А. Максимов. Для захисту сперматозоїдів за дії чинників ТКС при заморожуванні сперми до -196°C його почали використовувати у 1930...1960-тих роках [199, 206, 208, 238, 483, 514, 523]. Однак інтенсивний пошук оптимальних умов, які у майбутньому забезпечать максимально можливу кількість функціонально повноцінних сперматозоїдів у деконсервованих спермодозах, ще до тепер не дав однозначної відповіді на питання щодо ступеня та параметрів концентрації його захисного впливу. Дія гліцерину на клітину – подвійна. З одного боку він поводить себе як кріопротектор, з іншого – як сполука, фізичні і хімічні властивості якої негативно діють на функціональний стан сперматозоїдів.

За дії екстремальних чинників ТКС гліцерин зменшує швидкість процесу кристалізації розчинів, знижує осмотичний тиск і точку їх замерзання, гальмує обмінні процеси і ступінь дисоціації солей у системі “середовище - клітина”, розчиняє фосфоліпіди і підвищує захисний вплив жовтку. Вказаний комплекс дії захищає сперматозоїди від механічного тиску кристалів льоду, а їх білок – від денатурації [208, 279, 483].

Дія гліцерину на клітину має і негативну сторону: життєздатність сперматозоїдів знижується; втрачається рухливість і запліднювальна здатність. Знижується активність ферментів, підвищується проникність акросоми і цитоплазматичної мембрани, змінюється стан їх екзо- і ендоструктури [238, 463, 514, 523].

У 1950...1960-ті роки вчені вважали, що гліцерин проникає у сперматозоїди дуже повільно, тому тривалість етапу вирівнювання концентраційного градієнту у системі “середовище - клітина” за $2...4^{\circ}\text{C}$ становила 12...24 год [25, 523]. Згодом виявили, що введені у ЗС розчини вуглеводів дозволяють зменшити тривалість етапу до 2...6-ти год [79, 232, 290]. Проте у 1970-ті роки [199] доведено, що вирівнювання концентрації розчиненого у системі “середовище - клітина” комплексу неорганічних та органічних сполук закінчується за 5...7 хв.

Не знайдено ще також однозначної відповіді на питання щодо використання граничних доз гліцерину у ЗС та ступеня їх захисного впливу на сперматозоїди. Тому рекомендована межа його оптимальної концентрації – різна. Одні [238, 279, 514, 523] пропонують використовувати у ЗС 1...6 % розчини. Інші [208, 322, 463] – підвищують параметри концентрації гліцерину до 7...25 % і запевняють, що після деконсервації спермодоз життєздатність сперматозоїдів зберігається на високому рівні.

Оскільки хімізм шкодочинного впливу гліцерину на сперматозоїди виражений реакцією його окиснення до диоксиацетону та гліцеринового альдегіду, а їх кінцевими продуктами розпаду є токсична щавелева кислота [173], то Е. М. Платов [110, 232, 233] і Ф. І. Осташко [202], які у 1960...1970-ті роки використовували високу концентрацію гліцерину, у 1980...1990-ті почали рекомендувати параметри низької [322, 483, 523], а Т. Стоянов [279] навіть довів можливість виживання кріоконсервованих сперматозоїдів у середовищах без гліцерину.

Вивчення особливостей захисного впливу вуглеводів на функціональний стан сперматозоїдів започаткував І. І. Іванов [76...79]. Вчений виходив з того, що зберігання сперми за 37 °С дуже швидко знижує запаси енергетичних речовин спермальної плазми та сперматозоїдів. Тому він вважав, що вуглеводи до ЗС слід додавати в якості ефективного джерела енергії.

Однак, В. К. Мілованов [162...169] встановив, що власних запасів енергетичних речовин у спермі вистачає на достатньо тривалий час. Вчені знайшли, що причиною адинамії сперматозоїдів є накопичення у спермі продуктів розпаду енергетичних речовин – аміаку та молочної кислоти. Сперматозоїди переходять у стан анабіозу і, якщо переміна рН середовища незначна, то клітини зберігають здатність до відновлення руху.

Після впровадження у практичну роботу держустанов ТКС до –196 °С вуглеводи розглядають з одного боку як джерело легко доступної енергії для сперматозоїдів, з іншого – як речовини, що захищають їх акросому і

цитоплазматичну мембрану від негативного впливу чинників етапів консервації сперми і деконсервації спермодоз [232, 290].

У ЗС використовують моно- (глюкоза, галактоза, ксилоза, рамноза), ди- (лактоза, сахароза, мальтоза), полівуглеводи (рафіноза) і шестиатомні спирти (маніт, інозит). Більшість вчених вважає, що моновуглеводи малоефективні, ди- – значно кращі, а полі- – володіють найбільш вираженими захисними властивостями [4, 25, 65, 99, 232].

Їх захисна роль – багатогранна і різнопланова, а саме: вуглеводи формують буферність середовища, оптимізують перебіг обмінних процесів, захищають сперматозоїди від шкодочинної дії холодового і осмотичного “шоку”, стабілізують температуру утворення внутрішньоклітинного льоду і ліпопротеїнові комплекси мембран, частково обезводнюють сперматозоїди, знижують електропровідність сперми [79, 232, 290, 380, 445].

Із вивченого спектру вуглеводів найбільш важливою речовиною ЗС є лактоза. Однак щодо параметрів її оптимальної концентрації вчені мають різні точки зору. Якщо А. Д. Курбатов [110] і О. Д. Бугров [202, 206] віддають перевагу низьким параметрам концентрації (1,85...6,0 %), то Н. Желтобрюх [6] і Е. М. Платов [2, 110, 154] підвищують її до 7...10 %, а В. М. Кушнір [116, 117] – до 11...16 %. Можливо, що визначена і рекомендована виробництву дуже широка межа (2...16 %) оптимальних параметрів концентрації вуглеводів пов’язана з їх незначною шкодочинною дією на стан структури й функцій клітин.

Сучасні вчені досліджують також захисні властивості полівуглеводів. Їх роль у організмі людини, тварин і рослин – різностороння. Крохмаль, глікоген, інουλін використовується у якості енергетичних речовин, хондроїтинсірчана кислота, клітковина, хітин, манани і галактани – у якості захисного матеріалу для формування структури тканин і органів. Багато з них – гіалуронова, хондроїтинсірчана кислоти та капсулярні полівуглеводи бактерій – поліуроніди і гепарин утворюють стійкі комплекси з білками – глікопротеїди. Тому, у 1980...1990-тих роках вказану властивість, яка забезпечує антикоагулянтну

здатність та стабілізацію лізосомальних фракцій гомогенатів органів і тканин, взяли за основу для проведення досліджень, метою яких було вивчення особливостей впливу гепарину на функціональну повноцінність ізольованих клітин [42, 408, 455, 521].

Власне початком такого роду досліджень, очевидно, слід вважати роботу, яку в СРСР провели Ю. Л. Максимов і Н. І. Максимова [133]. Вивчаючи особливості виживання сперматозоїдів за 0 °С вони прийшли до висновку, що основною причиною адинамії сперматозоїдів слід вважати не дефіцит енергетичних ресурсів, а негативний вплив умов охолодження сперми. Тому, в якості додаткового засобу, який мав би сприяти виживанню сперматозоїдів та зберігати початковий рівень їх запліднювальної здатності вчені використали гомогенат печінки сільськогосподарських тварин.

Експерименти показали, що свіжі гомогенати печінки кролів, свиней та великої рогатої худоби ефективно захищають сперматозоїди від негативного впливу умов зовнішнього середовища. До 10 см³ розріджувача додавали 0,02...0,05 г гомогенату. Його дія нівелювала шкодочинний вплив “холодового шоку”, оптимізувала осмотичний тиск і рН оточуючого сперматозоїди середовища. Зробили також спробу замінити жовток середовища на гомогенат печінки, але без жовтку захисний вплив гомогенату виявився неефективним.

З’ясовуючи природу діючої речовини дослідники прийшли до висновку, що гомогенат печінки має набагато вищі захисні властивості, ніж його складові – фосфатиди, фосфо- і глікопротеїни. Перевагу гомогенату пояснили складною, комплексною взаємодією з цитоплазматичною мембраною. Але чинник дії, який сприяв збереженню життєздатності сперматозоїдів та їх запліднювальної здатності, залишився нерозкритим.

У 1985 році Г. В. Зверева, В. М. Максим’юк і Л. А. Черномаз отримали авторське свідоцтво на середовище для кріоконсервації сперматозоїдів. До складу лактозо-жовтково-гліцеринового ЗС ввели гепарин, який на усіх етапах ТКС підвищував ефективність зберігання первинного стану життєздатності, структури акросоми й цитоплазматичної мембрани клітин.

З цього часу кріобіологи провідних лабораторій світу [408, 455, 466, 467, 521] спрямували дослідну роботу на вивчення захисних властивостей гепарину. Встановили, що його сульфогрупи взаємодіють з полівуглеводами передньої ділянки головки сперматозоїдів. Вказана взаємодія інактивує ферменти гіалуронідазного типу, стимулює акросомну реакцію і зберігає запліднювальну здатність сперматозоїдів. Гепарин викликає їх агрегацію під час капаситації [455], сприяє пенетрації в яйцеклітину [42], блокує мейоз ооцитів, знижує число дегенерованих клітин і збільшує вихід зародків [408, 466]. Слід також віддати належне роботам, результати яких вказують на індукцію захисного впливу гепарину іонами кальцію [408, 439]. Однак, не зважаючи на те, що наведений етап вивчення захисного впливу гепарину на сперматозоїди уже достатньо тривалий, рекомендовані параметри його оптимальної концентрації у ЗС – різні.

Пріоритет на відкриття захисних властивостей жовтку та його ролі у збереженні функціональної повноцінності сперматозоїдів мають російські вчені В. К. Мілованов і О. А. Селіванова [168]. Але, як стверджують Г. У Солсбері і Н. Д. Ван-Демарк [273] виявлена властивість жовтку захищати сперматозоїди від негативного впливу холодового “шоку” не була розвинута ними до логічного кінця. Тому Р. Н. Phillips відкрив її знову, щоб у якості обов’язкового компоненту, ввести до складу ЗС.

Вплив жовтку на сперматозоїди слід розглядати не як специфічну, а як комплексну дію вуглеводів, білків, амінокислот, вітамінів, сульфгідрильних груп, антикоагулянтних чинників тощо [62, 314, 343, 391, 540]. Вважають, що захисний ефект пов’язаний із здатністю жовтку взаємодіяти з ліпопротеїновими комплексами мембран, що забезпечує їх механічну стійкість [44...47, 156, 157, 442]. Емульсія жовтку нівелює шкодочинний ефект гіпо- та гіпертонічної дії компонентів ЗС, що дозволяє сперматозоїдам тривалий час зберігати рухливість та запліднювальну здатність [61, 62, 444, 480, 508].

Діючу речовину жовтку (лецитин) визначили R. Willet і I. I. Соколовська [270], які довели, що окремо взяті компоненти жовтку – менш ефективні, ніж комплекс його складових. Результати вказаних робіт підтвердили вчені [314,

444, 508], які вивчали дію окремих фракцій жовтку (фосфатидилхолін, ліпоальбумін, ліпоглобулін, ліповітелін) на функціональний стан деконсервованих сперматозоїдів. Однак Ф. І. Осташко [199, 201, 202, 205] разом із позитивною дією жовтку виявив токсичний вплив перекису водню, який накопичується у середовищі після реакції дезамінування амінокислот l-тироzinу, l-триптофану і l-аланіну.

Ступінь шкодочинної дії жовтку на сперматозоїди залежить від його концентрації у середовищі. Концентрація жовтку, яка вища ніж 30 %, починає знижувати рухливість клітин. При 94 % його вмісту у середовищі настає повна адинамія сперматозоїдів [314]. Тому, більшість рекомендованих доз, які пов'язують з його оптимальною захисною дією, не виходять за межу 1...30 %. Рекомендації, щодо використання оптимальних параметрів концентрації жовтку у ЗС, – різні. Якщо І. І. [272], В. К. Мілованов [168], І. Н. Шайдуллін [301, 302], R. Vishwnath [540], А. Марющенко [200], А. М. Гуськов [46, 47, 228], А. Н. Варнавський [29] оптимальною межею вважають 2...14 %, то О. Д. Бугров [25], А. П. Кругляк [112], L. Amirat [343], А. Ritar [480], М. Reed [580], В. К. Мілованов [166] підвищують її до 15...30 %. Є також невелика група вчених, які намагаються використовувати безжовткові ЗС [29, 51, 52, 301].

Оскільки при окисленні гліцерину [208] та жовтку [204, 540] утворюються токсичні продукти розпаду, то впродовж кількох десятків років вчені ведуть інтенсивний пошук індиферентних речовин, продуктами розпаду яких є CO_2 і H_2O [195, 238, 301, 498]. До групи вказаних хімічних сполук належать: диметилсульфоксид (ДМСО), полівінілпірролідон (ПВП), поліетиленоксид (ПЕО), етиленгколь (ЕГ) та інші. Але, опубліковані науковою літературою, результати пошуку вчених – неоднозначні. Ф. І. Осташко і О. Д. Бугров [206] вважають, що захисні властивості цих сполук можуть проявитися за певних, ще не досліджених умов. Тому вони пропонують не припиняти пошук, але А. Н. Варнавський [29] і Т. Sexton [498] – не рекомендують їх використовувати взагалі.

Не зважаючи на різні точки зору до найбільш перспективних речовин, які можна використовувати для ефективної кріопротекції сперматозоїдів, відносять ДМСО. Дослідження його захисних властивостей розпочав J. Lovelock. Однак базовий висновок з проведеної роботи був не на користь ДМСО. Цей кріопротектор знижував запліднювальну здатність сперматозоїдів і збільшував число деструктивних клітин у ЗС. Разом з цим А. Д. Курбатов [110] знайшов, що ДМСО пролонгує тривалість виживання сперматозоїдів і гальмує вихід гіалуронідазних ферментів з них, а його низька (2...4 %) концентрація є більш ефективною ніж висока (6...8 %).

Сучасні вчені отримали позитивні результати після введення у ЗС екстрактів білків та амінокислот [11, 173, 374]. Захисну дію білків пояснюють особливостями будови молекул та їх взаємодіями з цитоплазматичною мембраною. Найбільш перспективним кріопротектором, очевидно, слід вважати альбумін сироватки крові бугая (АСКБ). Після введення у ЗС 15 % АСКБ, інтенсивність руху сперматозоїдів зростає, збільшується кількість живих клітин, знижується деструкція їх акросоми і цитоплазматичної мембрани, ініціюється реакція капаситації, сповільнюється вихід ферментів та іонів солей макро- і мікроелементів, зберігаються високі показники запліднювальної здатності [374, 418, 439].

Однак окремі вчені [173, 440, 539] зареєстрували шкодочинний вплив АСКБ на функціональний стан сперматозоїдів. Виявили, що зміна відношення білку у системі “середовище - клітина” знижує рухливість та запліднювальну здатність сперматозоїдів.

Таким чином проведений аналіз результатів виконаних робіт свідчить, що для усіх компонентів ЗС, властива двояка і захисна, і шкодочинна дія на стан структури й функцій сперматозоїдів. Недоліком проведених експериментів є те, що вчені переважно лише реєструють результат впливу умов кріоконсервації та властивостей кріопротекторів на сперматозоїди, а механізм і способи регуляції їх дії – залишаються не до кінця з'ясованими. Тому проблема корекції впливу чинників ТКС, моно- і полікомпонентних ЗС за дії наднизької температури

(–196 °C), пошуку та ідентифікації базових чинників захисного впливу, одержання об’єктивних знань про механізми їх дії, що в майбутньому може суттєво збільшити відсоток функціонально повноцінних сперматозоїдів у деконсервованих спермодозах, залишається актуальною. У цьому зв’язку пропозицію Ф. І. Осташко [207] не припиняти досліджень, за яких вивчені і застосовані способи захисту сперматозоїдів можуть проявитися у повну силу, слід вважати слушною.

1.5 Регуляція метаболічних шляхів в системі ”середовище-клітина”

Численні узагальнення з проведених досліджень, висновки яких спрямовані на обґрунтування особливостей захисної дії екстремальних чинників ТКС, моно- і полікомпонентних ЗС на стан структури й функцій сперматозоїдів, а їх результат – на створення оптимальних умов для подовження тривалості зберігання життєздатності та запліднювальної здатності статевих клітин поза межами організму людини і тварин, одержані переважно емпіричним способом. Це суттєво обмежує можливості досягнення високих позитивних результатів. Для того, щоб віднайти простий і ефективний науково-обґрунтований спосіб розв’язку наведеної проблеми сучасна кріобіологічна наука має спиратися на детальні й об’єктивні знання про особливості змін, які відбуваються у системі “середовище - клітина” [312, 363, 427, 458, 474, 557].

Оскільки ТКС слід розглядати як суму дії способів і засобів переведення сперматозоїдів із активного стану в анабіоз та їх наступного повернення в активний стан, то важливим джерелом інформації для вирішення даної проблеми можуть стати лише отримані на клітинному і субклітинному рівнях нові, ще не відомі і не пояснені факти, які можуть бути виявлені виконаними різного роду експериментами. Але нові гіпотези й погляди мають спиратися на відомі науці спроби пояснити механізм адаптації сперматозоїдів до дії екстремальних чинників ТКС, фізичних і хімічних властивостей кріопротекторів та ЗС. У цьому зв’язку важливим аргументом є одержання

об'єктивних знань про причини і наслідки тої чи іншої деструктивної дії екстремальних чинників на клітину.

Реакцію клітини на вказану дію сучасні вчені пояснюють дискоординацією функцій ізольованих та неізольованих клітин, інгібуванням ферментних систем, дегідратацією елементів їх структури, змінами фізичних і хімічних властивостей білкових макромолекул, які відбуваються за рахунок фазових переходів [15, 25...27, 41, 81, 199, 245...248, 438].

Важливою ознакою “реакції - відповіді” на дію чинників ТКС є так званий стан “холодового шоку”. Внаслідок різкого зниження температури навколишнього середовища відбувається желатинізація цитозолу клітин. Але при вимерзанні рідкої фази їх чутливість до “холодового шоку” щезає. Механічна дія напружених ліпідних шарів мембран позбавляє елементи структури клітин джерел енергетичного живлення і води. За 2...3 с активного впливу холоду клітини можуть втратити ознаки життя. Переміщений із середовища в клітину Ca^{2+} коагулює білки, а ТМД зменшують щільність і еластичність акросоми й цитоплазматичної мембрани. Проте реакції гліколізу й фруктолізу у системі “середовище - клітина” не припиняються [103, 104, 245, 284, 303].

За рахунок процесів адсорбції і зв'язування молекул води знижується інтенсивність дифузії розчинених речовин, зменшується тиск водяної пари. У клітині підвищується концентрація осмотично активних іонів та молекул, зростає гідростатичний тиск. З цього приводу слід зважати на те, що за однакових ситуацій окремі клітини можуть мати низьку або високу індивідуальну природну стійкість (резистентність) до дії екстремальних чинників ТКС [25].

Здатність окремих речовин, які захищають клітину від шкочинного впливу низьких температур, вчені пов'язують з фізичними і хімічними властивостями їх гіпертонічних (ЕГ – 5,3, гліцерин – 3...8, глюкоза – 1,5, натрію хлорид – 1 %) розчинів. Ці сполуки повинні бути легкорозчинними, мати низькі параметри температури плавлення і токсичності, а їх іони і

молекули – здійснювати часткову дегідратацію екзо- і ендоструктур, легко проникати у клітину. Вказані властивості використаних сполук створюють умови за яких, встановлений системою “середовище - клітина” концентраційний рівень іонів і молекул наносить відносно низьку шкоду нативному стану структури й функцій клітин.

S. Leibo [440] стверджує, що кріопротектори (ЕГ, ПЕО, ПВП, гліцерин, моно-, ди- і поліуглеводи, білки, амінокислоти), приєднуючись водневими зв'язками до гідрофільних груп білків і зв'язуючи воду екзо- та ендоструктур акросоми і цитоплазматичної мембрани утворюють навколо них захисну оболонку. З цього приводу М. EL-Harairy [383] наголошує на тому, що їх зв'язок відбувається з окремими ділянками білків (“айсберги”). Це знижує інтенсивність процесу утворення кристалів льоду й зменшує денатурацію білка. Методом ядерномагнітного резонансу (ЯМР) з використанням спіні-мітки доведено, що гліцерин, утворюючи бівалентні зв'язки з іонами металів (Cu^{2+} , Fe^{2+}), захищає клітину від ТМД, створює дисбаланс іонів та молекул [476]. Для утворення такого зв'язку молекула кріопротектора має мати вільну групу $-\text{CH}-$, аміно і амідогрупи; володіти лужними властивостями.

На стан води у клітині впливають катіони Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , які взаємодіють з молекулами води слабкими ван-дер-Ваальсовими силами, але їх захисна дія на клітину є доволі значною. Присутність у ЗС Na^+ ініціює утворення рідкого (склоподібного, вітрифікованого) льоду [25, 41, 245...248, 375, 411].

Здатність кріопротекторів до вітрифікації (гліцерин, ДМСО, донатори Na^+) зменшує ступінь ТМД і рівень концентрації сольових розчинів у клітині. За цих умов кріопротектори, які утворюють комплекси з іонами металів, упереджуючи деструкцію активних центрів біомакромолекул, нівелюють шкодочинну дію розчинів, зменшують об'єм кріоконсервованого об'єкту [458].

Встановлено, що біоорганічні полімери (моно-, ди-, поліетиленгліколі) утворюють навколо клітин захисну оболонку, яка надає акросомі й цитоплазматичній мембрані сперматозоїдів додаткову механічну стійкість. Така підсилена мембрана служить теплоізоляційним шаром, що захищає клітину від

переохолодження. Кріопротектори гліколевого ряду, за допомогою зв'язаного киснем полярного атому вуглецю, утворюють гідратні шари у розчинах. Меандрова структура оксиетильних сполук молекул ПЕО зумовлює гвинтове розміщення атомів кисню. Це полегшує доступ оксиетильних ланок ПЕО до молекул води. За типом оксонієвих сполук кисень приєднується до полімеру, утворюючи малорухому, аморфну, дрібнокристалічну фазу. Це обмежує трансмембранні переміщення осмотично активних речовин, які розчинені у системі “середовище - клітина”.

Низькомолекулярні вуглеводи (рибіт, маніт, сорбіт) протидіють дегідратації клітин, утримують SH-групи білків на віддалі, що сповільнює реакцію їх взаємодії. Стійкість SH-груп цитоплазматичних білків до окиснення у дисульфідні групи $-S-S-$ підсилює введення в ЗС інгібіторів (глутатіон), а стану структури сперматозоїдів – введення стабілізаторів (n-хлор-меркуробензоат, етилмаленамід, меркаптоетанол) [350, 368, 427, 438, 453, 528].

Тому вчені вважають, що допоки не буде знайдено речовини, які надійно захищатимуть SH-групи від розпаду і утворення дисульфідних ($-S-S-$) зв'язків, у ЗС краще всього використовувати ПЕО і ДМСО, захисна дія яких є більше фізичною, ніж хімічною.

На даний час прийнято вважати, що смерть клітин настає від денатурації білків і ліпопротеїнів у мембранах. Ефективний захист елементів їх структури можна забезпечити, якщо у практику ввести нові кріопротектори. Вони мають бути легкорозчинними у воді, утворювати міцні зв'язки з гідратними оболонками біомакромолекул. Отже, необхідність проведення пошукових досліджень все ще залишається актуальним завданням сучасних кріобіологів. Результати їх пошуку мають бути спрямовані на обґрунтування механізму захисного впливу біоструктур від шкодочинної дії ТКС, що дозволить віднайти більш ефективні і менш токсичні сполуки, які стабілізують гідратні оболонки і функціональні групи макромолекул цитоплазматичних мембран.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали досліджень

2.1.1. Тканини органів статевих систем самців і самок

Матеріал для досліджень надавали працівники клініко-діагностичних лабораторій Львівської обласної клінічної лікарні та Львівської міської клінічної лікарні швидкої медичної допомоги. Загалом проаналізували еякуляти 180 чоловіків, вік яких в середньому становив $30,5 \pm 4,5$ років. Якісний стан еякулятів оцінювали згідно з критеріями (WHO, 2010). Відбір матеріалу здійснювали щодо передбачених заходів, які спрямовані на забезпечення задовільних умов збереження здоров'я пацієнта; дотримання його прав, людської гідності та морально етичних норм. Умови відбору дослідних зразків відповідали вимогам принципів Гельсінської декларації охорони прав людини, конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину та положенням відповідних законів України.

Проби сперми бугаїв отримували у кріобіотехнологічній лабораторії Дрогобицького державного міжрайплемоб'єднання; тканин статевих органів самців і самок – у цеху забою сільськогосподарських тварин Пустомитівської бойні. Для досліджень використали зразки 690 еякулятів бугаїв 2...10-річного віку та проби тканин статевих органів бугаїв і корів ($n = 10$).

Проби тканин органів статевих систем бугаїв 12...18-місячного та корів 2...6-річного віку чорно-рябої породи відбирали за умов і режиму роботи Пустомитівської районної бойні сільськогосподарських тварин одразу після їх забою. За методиками [145, 151] у ФВЕ тканин статевих органів, визначали показники концентрації Ca^{2+} , K^{+} , Na^{+} та її відношень між різно- й однойменними парами вільних та зв'язаних іонів з молекулами легко-, важко- і нерозчинних комплексних сполук органічних та неорганічних речовин.

Досліди на тваринах проводили за умов, що передбачають дотримання принципів біоетики, відповідно до вимог положення “Європейської конвенції про захист хребетних тварин”, яких використовують для проведення експериментів та з іншою науковою метою (Страсбург, 1986 р.); директив Ради Європи 86/609/ЕЕС (1986 р.); Закону України №3447-IV “Про захист тварин від жорстокого поводження”; загальних етичних принципів щодо проведення експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (2001р.)

Дослідження проводили за умов експериментальної бази кафедральних лабораторій медичної біології, генетики і паразитології, клінічної лабораторної діагностики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; лабораторії електронної мікроскопії біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка; біології відтворення тварин Інституту сільського господарства Карпатського регіону НААН.

Як модельні системи для вивчення особливостей впливу трансмембранних змін гомеостазу іонів і молекул біологічно активних речовин на стан структури й функцій сперматозоїдів за дії екзо- та ендогенних чинників використали проби спермальної плазми і сперматозоїдів еякулятів чоловіків і бугаїв, ФВЕ тканин статевих органів бугаїв і корів (Рис. 2.1.).

У пробах сперми чоловіків низької якості за дії ендогенних чинників вивчали особливості гомеостазу іонів лужних металів, зміни активності транспортних АТФаз та концентрації про- і протизапальних інтерлейкінів; у пробах сперми бугаїв високої якості за дії екзогенних чинників – особливості гомеостазу іонів лужних металів та молекул етерифікованих і неетерифікованих, насичених і ненасичених ЖК, у ФВЕ тканин статевих органів за дії ендогенних чинників (віковий і функціональний аспекти впливу) – особливості гомеостазу Ca^{2+} , K^{+} , Na^{+} .

Динаміку показників рухливості сперматозоїдів визначали візуально за десятибальною шкалою, кількості живих і мертвих – методом диференційного фарбування, тривалості виживання – методом світлової мікроскопії, концентрації сперматозоїдів – методом фотоелектроколориметрії за вимогами ГОСТ-20909.3-75-ГОСТ 20909.6-75.



Рис. 2.1. Схема оцінювання особливостей впливу ендо- та екзогенних чинників на повноцінність стану структури й функцій сперматозоїдів.

Кріоконсервацію сперматозоїдів проводили згідно існуючих вимог до ТКС необлицьованими гранулами (Курбатов А. Д., 1988; Осташко Ф. И., 1995). Особливості змін екзоструктури сперматозоїдів (Максимюк Г. В., 2005) та гомеостазу іонів і способу їх переміщення у системі “середовище - клітина” (Максимюк Г. В., 2011, 2012) вивчали за вимогами розроблених нами методик; активності транспортних АТФаз в перфорованих мембранах сперматозоїдів – за вимогами методик (Петруняк В. В., 1990 та модифікованої і стандартизованої Максимюк Г. В., 2010), концентрації ЖК – за методикою

(Рівіс Й. Ф., 1997, 2010). У зразках спермальної плазми, згідно з вимогами інструкції до набору реактивів фірми “Вектор-Бест”, визначали концентрацію інтерлейкінів: IL-6 (набір реагентів А-8768), IL-8 (набір реагентів А-8762), IL-10 (набір реагентів А-8774).

Математичну обробку та аналіз експериментальних даних проводили за допомогою програми Microsoft Excel. Між дослідними і контрольною групами за критерієм Стьюдента (t) знаходили вірогідність різниці (P) визначених показників ($M \pm m$). Зміни вважали вірогідними, якщо їх визначений показник змін знаходився у межах $P \leq 0,05 \dots 0,001$. Для окремих показників вираховували критерій детермінованості досліджуваних ознак (r).

2.1.2. Сперма, спермальна плазма, сперматозоїди

Проби сперми чоловіків для досліджень брали у центральній лабораторії Львівської обласної клінічної лікарні та в лабораторії Львівської міської лікарні швидкої медичної допомоги; проби сперми бугаїв – у кріобіотехнологічній лабораторії Дрогобицького державного міжрайплемоб'єднання.

Дослідження проводили за умов експериментальної бази кафедральних лабораторій медичної біології, генетики і паразитології, клінічної лабораторної діагностики, лабораторії електронної мікроскопії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; лабораторії електронної мікроскопії біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка; лабораторій спектрального аналізу і електронної мікроскопії, мінерального і амінокислотного живлення, біології відтворення тварин Інституту сільського господарства Карпатського регіону НААН.

Особливості змін структури й функцій сперматозоїдів людини вивчали в еякулятах отриманих від 180 чоловіків, репродуктивний період яких не виходив за межу 27...35 років. Сперму отримували способом мастурбації після 3...5 днів утримання чоловіків від статевого акту. Отримані еякуляти ділили на дві групи – низької та високої якості. До першої відносили еякуляти, об'єм яких

становив $2...4 \text{ см}^3$; концентрація сперматозоїдів – $60...120 \text{ млн/см}^3$; рухливість – $70...80 \%$; кількість патологічних форм – $20...30 \%$ [548]. Якщо вказані показники виходили за межу наведених параметрів, то еякуляти відносили до груп низької якості.

Особливості змін структури й функцій [146, 151, 152, 161] сперматозоїдів у нативній спермі тварин та їх динаміки після розрідження, еквілібрації й деконсервації вивчали у пробах дуплетних еякулятів високої якості, які отримували від бугаїв класу еліта-рекорд, 2...10-річного віку, чорно-рябої місцевої, британофризької, голштинської, німецької, червоної датської, симентальської, лімузинської та абердинангуської порід. Ліміти середніх значень об'єму еякулятів становили $3...5 \text{ см}^3$; концентрації сперматозоїдів – $0,1...2,3 \text{ млрд/см}^3$; рухливість – $70...90 \%$; кількість патологічних форм – $3...5 \%$.

За визначеними у спермальній плазмі та сперматозоїдах концентраціями Ca^{2+} , K^+ , Na^+ еякуляти плідників ділили на три групи. У першу групу відносили еякуляти, параметри концентрації K^+ яких були низькі ($16...30 \text{ мМ}$), у другій – середні ($31...45 \text{ мМ}$), у третій – високі ($46...70 \text{ мМ}$).

Аналіз змін стану структури й функцій сперматозоїдів, параметрів концентрації та її відношень між одно- ($\text{Ca}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$, $\text{K}^+:\text{K}^+$, $\text{Na}^+:\text{Na}^+$) і різнойменними ($\text{Na}^+:\text{K}^+$, $\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$, $\text{K}^+:\text{Ca}^{2+}$) парами іонів у відкритих системах типу “середовище - клітина” проводили за сформованою базою даних, яку отримали в експериментах з нативною та кріоконсервованою спермою.

У контрольних та дослідних зразках сперми визначали: концентрацію, рухливість, термін виживання, відсоток живих і мертвих сперматозоїдів; ступінь поліморфізму й деструкції акросоми та цитоплазматичної мембрани; зміни концентрації й відношень Ca^{2+} , K^+ , Na^+ ; концентрацію ЖК у спермальній плазмі та сперматозоїдах, активність АТФаз у сперматозоїдах та концентрацію інтерлейкінів (IL-6, IL-8, IL-10) у спермальній плазмі.

Вказані показники використали для встановлення ступеня захисного впливу гліцерину, глюкози, лактози, гепарину, ДМСО, АСКБ, жовтку та $2,8 \%$

розчину НЦ на стан структури і функцій сперматозоїдів, динаміку показників концентрації й відношень одно- і різнойменних пар іонів за дії умов кріоконсервації сперми у монокомпонентних ВРК і полікомпонентних ЗС.

Годівля і утримання бугаїв з врахуванням стану їх живої маси і статевого навантаження відповідали вимогам, які передбачені відповідними ветеринарно зоотехнічними нормативними документами [80].

Сперму отримували у штучну вагіну. Режим статевого навантаження бугаїв – дві садки, два рази в тиждень. Досліджували еякуляти високої й низької якості. Візуальну оцінку сперми проводили згідно вимог інструкції МСГ СРСР [80]. Рухливість сперматозоїдів визначали за десятибальною шкалою ГОСТ-20909.3-75-ГОСТ 20909.6-75 [39], кількість живих і мертвих – за методикою Морозова В. А. [303], тривалість виживання – за методикою Грищенко В. М., Паращук Ю. В. [41], концентрацію сперматозоїдів – фотоелектроколориметричним методом [39]. Особливості змін стану структури сперматозоїдів – за методикою, яку розробили для проведення електронно-мікроскопічних досліджень [152, 161]; змін гомеостазу та способів переміщення Ca^{2+} , K^{+} , Na^{+} у системі “середовище - клітина” – за методиками [145, 151].

Для аналізу особливостей зв'язку показників концентрації іонів лужних металів та концентрації сперматозоїдів використали дані еякулятів, ліміт мінімальних і максимальних значень яких становив $0,1 \dots 2,3$ млрд/см³.

Особливості впливу сезону року, породи, віку бугаїв вивчали за показниками еякулятів високої якості. Зимою, весною, літом і восени від 68 бугаїв 9 порід віком 2...10 років отримували еякуляти, спермальна плазма та сперматозоїди яких постійно мали низьку, середню або високу концентрацію K^{+} . Оцінювали їх органолептичний стан (колір, в'язкість, наявність сторонніх домішок тощо), реєстрували об'єм. Показник рухливості сперматозоїдів у них був не нижчий за 7,0 балів, концентрації – не менший за $0,7$ млрд/см³. Неякісні еякуляти вибраковували. Допущені до ТКС перший і другий еякуляти змішували, а їх утворену суміш розріджували дослідним лактозо-жовтково-

гліцериновим і контрольним гепаринізованим ЗС з таким розрахунком, щоб у кожній пробі (дослід, контроль) було не менше 10 млн рухливих клітин.

2.2. Методи досліджень

2.2.1. Визначення концентрації вільних і зв'язаних іонів

Використані прийоми методики дозволяють визначити у фракціях водних екстрактів відношення концентрації вільних і зв'язаних форм іонів з легко-, важко- та нерозчинними у воді молекулами комплексних сполук у тканинах статевих органів [31, 145, 222].

Проби тканин дослідних органів відбирали одразу ж після забою тварин. Їх первинна маса становила 5,0 г. Відібрану пробу різали скальпелем на дрібні частини, клали у бюкс, який завчасно зважували механічними вагами з точністю до 0,01 г. Пробу з бюксом зважували другий раз і переносили у сушильну шафу.

За 105 °С пробу висушували до постійних значень її сухої маси. Динаміку маси контролювали через кожні 24 год, впродовж 7...8 діб. Для здійснення вказаної процедури бюкс закривали корком і переносили пробу із сушильної шафи в ексикатор. Висушену пробу охолоджували до 15...18 °С. Зважували демпферними вагами з точністю до 0,0001 г. Пробу розмелювали електричним млинком. Розмелену масу ретельно розтирали в агатовій ступці до дрібнодисперсного порошку. Від розтертої маси відбирали 0,5 г порошку, до якого доливали 4,5 см³ бідистильованої води. Залиту водою пробу у кварцевій центрифужній пробірці розмішували скляною паличкою і одразу, впродовж 5 хв за 800 g центрифугували. У відкремленій від екстрагованої маси рідині (фракція № 1), за вимогами методики [145], визначали концентрацію вільних іонів.

Екстраговану масу дослідної проби другий раз заливали бідистильованою водою, витримували 24 год. Екстракт від проби відокремлювали центрифугуванням. У відокремленій рідині (фракція № 2) визначали

концентрацію зв'язаних іонів з легкорозчинними комплексними неорганічними та органічними сполуками.

Екстраговану масу тканин третій раз заливали водою. Витримували 24 год і ще раз розділяли на дві фази. У відокремленій рідині (фракція № 3) визначали концентрацію іонів, які зв'язані з важкорозчинними у воді речовинами.

До залишків екстрагованої проби доливали 2,0 см³ “царської водки”. Реагенти акуратно змішували і, за 18...20 °С впродовж 24 год витримували у витяжній шафі. Непрореагований з компонентами проб об'єм “царської водки” обережно випаровували у витяжній шафі на відкритому вогні газового пальника або пісочній бані.

Позбавлену кислоти масу проби, що залишилася у центрифужній кварцевій пробірці, озолювали у муфельній печі за 450 °С. У пробірку до золи доливали 4,5 см³ бідистильованої води і визначали концентрацію іонів, які зв'язані з нерозчинними у воді сполуками (фракція № 4).

Переведення показників концентрації у показники вмісту здійснювали у такий спосіб. Визначені для ФВЕ № 1, 2, 3 і 4 величини показників додавали. Показник суми концентрацій приймали за 100 %, а величину кожної фракції (№ 1...4) – за x . Складали пропорцію і для кожної ФВЕ визначали показник вмісту іонів.

Для визначення концентрації іонів використовували реактиви кваліфікації “ХЧ” або “ЧДА”. Стандартні розчини готували самостійно. За кінцевий результат приймали отриману з двох визначень середню арифметичну величину (M). Похибка результатів визначень не перевищувала $\pm 5 \%$.

2.2.2. Способи одержання сперми

Нативну сперму отримували від плідників класу еліта-рекорд, які визнані держплемслужбою поліпшувачами породи і, які допущені до відтворення

поголів'я тварин у стаді (табл. 2.1.). Їх племінні якості підтверджені наявністю спеціального ідентифікаційного паспорта (племінне свідоцтво).

Таблиця 2.1.

Дослідні бугаї (порода, клас, вік, кличка, еякуляти)

№	Порода*	Клас	Бугаї (п), вік (рр.). Кількість дуплетних еякулятів (п)					
			2...3		4...8		9...10	
			бугаї	еяку- ляти	бугаї	еяку- ляти	бугаї	еяку- ляти
1	Місцева чорно-ряба (помісі)	Еліта-рекорд	4	26	5	63	6	92
2	Британофризька чорно-ряба		5	33	1	13	1	15
3	Голштинська чорно-ряба		15	99	2	26	1	15
4	Голштинська червоно-ряба		5	33	2	26	1	15
5	Німецька чорно-ряба		2	13	5	63	3	46
6	Червона датська		2	13	2	26	2	32
7	Абердин-ангуська		2	13	—	—	—	—
8	Симентальська		—	—	1	13	—	—
9	Лімузинська		—	—	—	—	1	15
Всього бугаїв – (п = 68). Всього еякулятів – (п = 690).			35	230	18	230	15	230

Примітка. Кличка бугаїв 2...3 річного віку. 1. Місцева чорно-ряба (Алий, Артек, Задорний, Радіус). 2. Британофризька чорно-ряба (Бідлі, Інвестор, Лінмет, Примсленд, Чайрмен). 3. Голштинська чорно-ряба (Баян, Гай, Дарел, Еліпс, Інка, Леопард, Марс, Матор, Маяк, Мерл, Ріпс, Сазан, Факел, Фаянс, Хасан). 4. Голштинська червоно-ряба (Канон Карнавал, Радій, Себастьян, Торо). 5. Німецька чорно-ряба (Павук, Файний). 6. Червона датська (Кагор, Пончик). 7. Абердин-ангуська (Рейн, Сейм).

Кличка бугаїв 4...8 річного віку. 1. Місцева чорно-ряба (Атмет, Ворон, Вулкан, Графік, Лось). 2. Британофризька чорно-ряба (Твін). 3. Голштинська чорно-ряба (Велетень, Крос). 4. Голштинська червоно-ряба (Громадний, Лірик). 5. Німецька чорно-ряба (Корал, Малий, Март, Ромен, Тихий). 6. Червона датська (Герой, Кудрявий). 8. Симентальська (Зеніт).

Кличка бугаїв 9...10 річного віку. 1. Місцева чорно-ряба (Бузок, Вітерок, Магніт, Регал, Терен, Флокс). 2. Британофризька чорно-ряба (Майстер). 3. Голштинська чорно-ряба (Рікардо). 4. Голштинська червоно-ряба (Ланцер). 5. Німецька чорно-ряба (Камиш, Корт, Медок). 6. Червона датська (Бігус, Кубок). 9. Лімузинська (Клен).

Перед взяттям сперми 10...15 хв для стимуляції статевої активності бугаїв вигулювали. Робили масаж яєчників і декілька хвилин витримували перед станком з манекеном. Від одного бугая впродовж семи діб отримували 2...4 еякуляти в'язкої консистенції, молочно-білого кольору без сторонніх домішок

(кров, гній, сеча). Другий еякулят отримували через 10...15 хв після першого. Інтервал їх статевого спокою становив 2...3 доби.

Сперму отримували у штучну вагіну. Зберігали у повітряному термостаті (шафі) за 35...37 °С, досліджували не пізніше 30 хв після одержання. До кріоконсервації допускали еякуляти, концентрація сперматозоїдів у яких була вищою за 0,7 млрд/см³, рухливість – не нижча 7 балів. Сперму, яка не відповідала перерахованим вище ознакам, вибраковували.

Для кожного етапу ТКС передбачено умови, яких обов'язково слід дотримуватися у науково-дослідній роботі. Тому для виготовлення моно- і полікомпонентних ЗС, компоненти яких виконують певну (екзо-, ендоцелюлярну) захисну функцію використовували реактиви, ступінь чистоти яких була кваліфікації “ЧДА”, або “ХЧ”. Зберігали реактиви у скляних банках темного кольору з притертими корками у холодильнику за 3...5 °С.

Після визначення показників якості сперми (рухливість сперматозоїдів становила 7...10 балів, концентрація – 0,7...2,0 млрд/см³), відібраний об'єм дуплетних еякулятів у відношенні 1:1 або 1:2 за 25...30 °С розріджували дослідним і контрольним ЗС (табл. 2.2). Розріджену сперму витримували 5...10 хв і, залежно від рухливості та концентрації сперматозоїдів, у градуйований змішувач другий раз обережно доливали розріджувач з таким розрахунком, щоб доданий об'єм ЗС забезпечував наявність в одній спермодозі 10...12 млн клітин з прямолінійним поступальним рухом [199, 207].

Таблиця 2.2

Параметри розрідження сперми високої якості

Бал	Концентрація сперматозоїдів, млрд/см ³													
	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8	1,9	2,0
	Співвідношення складових (сперма : розріджувач), см ³													
7	1:6	1:6	1:8	1:10	1:10	1:12	1:14	1:14	1:16	1:18	1:20	1:20	1:22	1:24
8	1:8	1:8	1:10	1:12	1:12	1:14	1:16	1:16	1:18	1:20	1:22	1:22	1:24	1:26
9	1:9	1:10	1:12	1:14	1:14	1:16	1:18	1:20	1:20	1:22	1:24	1:24	1:26	1:28
10	1:10	1:12	1:14	1:16	1:18	1:18	1:20	1:20	1:22	1:24	1:26	1:28	1:30	1:32

Розріджену сперму 4 год за 2...5 °С зберігали у холодильнику [55, 68]. Після етапу еквілібрації сперму заморожували у формі гранул на охолодженій азотом фторопластовій пластині. Залежно від поставленої задачі, гранули заморожували об'ємом 0,1 або 0,5 см³. Пластину ставили 5...10 см вище поверхні, налитого у спеціальний контейнер азоту. Пластмасовими капельницями у лунки наносили розріджену сперму. Пластину разом із гранулами на одну хвилину занурювали в азот і охолоджували до -196 °С. Після цієї процедури гранули без особливих проблем, відокремлюються від пластин. Зберігали їх у каністрах термосів Дюара, доверху заповнених азотом [110, 113].

Контроль за рухливістю сперматозоїдів здійснювали після 24 год витримування гранул у термосах. З термоса, пінцетом брали одну заморожену гранулу, яку переносили у флакон. У флакон завчасно наливали 1 см³, підігрітого до 37 °С 2,8 % розчину НЦ. За таких умов деконсервація гранул тривала не довше 30 с. Після зникнення останнього кристалика льоду, суміш сперми і цитрату ретельно перемішували скляною паличкою. На предметне скло наносили каплю сперми. Накривали її покривним скельцем і, при 37 °С у спеціальній камері, за допомогою світлового мікроскопу визначали рухливість сперматозоїдів.

До осіменіння тварин допускали проби сперми, у яких здатність до прямолінійного поступального руху зберігає не менше, ніж 30 % деконсервованих сперматозоїдів. Якщо рухливість клітин у деконсервованих гранулах була меншою за 3,0 бали, то гранули вибраковували [183, 199, 241].

Оцінювання впливу захисних властивостей ВРК та ЗС на стан структури й функцій сперматозоїдів проводили у пробах сперми трьох дослідних груп бугаїв віком 2...7 років британофризької і німецької порід та чорно- і червоно-рябих помісей голштинської породи. Сперму для досліджень відбирали одразу ж після одержання (нативна) та після дії чинників етапів ТКС (розрідження, еквілібрація, деконсервація).

Для контролю за змінами, що відбулися у відкритих системах типу “середовище - клітина”, користувалися показниками проб свіжоотриманої, нативної нерозрідженої сперми. Від змішаних дуплетних еякулятів високої якості відбирали 3,0 см³ сперми. Ділили її на дві частини. За однакового (1:1) відношення об’ємів, першу частину (2,0 см³) сперми використовували в якості контролю; другу (1,0 см³) – розріджували ВРК, емульсією жовтка, або ЗС.

Після кожного етапу ТКС відбирали 0,5 см³ сперми. У розділених на спермальну плазму (середовище) і сперматозоїди пробах визначали динаміку концентрації Ca²⁺, K⁺, Na⁺ та її відношень. Рухливість сперматозоїдів та стан структури їх акросоми й цитоплазматичної мембрани контролювали методами світлової та електронної мікроскопії.

Досліджували вплив водних розчинів глюкози, лактози і АСКБ – 1, 3, 6, 9, 12 ваг.%; гліцерину і ДМСО – 1, 3, 6, 9, 12 об.%; гепарину – 100, 200, 300, 400, 500, 600 од. дії і водної емульсії жовтку – 1, 5, 10, 15, 20 об.%. У ВРК вивчали особливості прямого захисного впливу окремо взятих кріопротекторів на клітину. У лактозо-жовтково-гліцериновому середовищі (дослід) та гепаринізованому (контроль) – особливості їх сумарного впливу.

Розріджену сперму 4 год витримували у холодильнику за 2...5 °С, заморожували – необлицьованими гранулами на фторопластовій пластині. Об’єм кріоконсервованих гранул становив 0,1 см³. Гранули зберігали 2...3 доби у термосах Дюара за –196 °С. Деконсервацію гранул проводили у водяній бані за 37 °С у 2,8 % розчині НЦ і без нього. Після повної рекристалізації гранул у спеціальній термостатованій камері визначали рухливість сперматозоїдів.

2.2.3. Визначення концентрації сперматозоїдів в еякулятах

Для побудови калібрувального графіка концентрацію сперматозоїдів в еякулятах визначали за допомогою світлового мікроскопа у камері Горяєва. В еритроцитарний меланжер до мітки “1” набирали сперму, а до мітки “101” – 3 % розчин NaCl (ступінь розведення в 100 раз). Вміст меланжера ретельно

перемішували. Перші 3...4 каплі не досліджували. Дослідну каплю сперми наносили на край притертого до поверхні камери покривного скла. Капля затікає під скло і заповнює об'єм камери. Підрахунок сперматозоїдів вели у 80 малих або 5 великих квадратах, які діагонально розміщені між вершинами прямокутника камери. Концентрацію клітин визначали формулою 2.1.

Для досліджень брали еякуляти з високою концентрацією сперматозоїдів. Концентраційний ряд (2,0; 1,8; 1,6 ... 0,2) проб готували з інтервалом 0,2 млрд/см³ сперми. Сперму розріджували 3,5 % розчином НЦ. Оптичну густину проб визначали фотоелектроколориметром ФЕК-М у кюветі шириною 10 мм з використанням червоного світлофільтра.

$$C = \frac{n \cdot D \cdot F}{N \cdot p \cdot 1000000}$$

(ф. 2.1.)

де C – концентрація сперматозоїдів (млрд/см³),

n – кількість підрахованих сперматозоїдів,

D – розведення сперми у меланжері,

F – площа одного малого квадрату (мм²),

N – кількість малих квадратів,

p – глибина камери (мм),

1000000 – коефіцієнт перерахунку для визначення концентрації сперматозоїдів.

В чистий флакон наливали 5,5 см³ 3,5 % розчину НЦ і доливали 0,5 см³ сперми. Показник шкали приладу множили на шість величин показника кривої калібрувального крафіка. Із $n = 3$ визначали середню арифметичну величину (M) концентрації сперматозоїдів (C).

2.2.4. Визначення рухливості сперматозоїдів

Показник рухливості сперматозоїдів визначали світловим мікроскопом. На предметне скло скляною паличкою наносили каплю сперми. До сперми додавали 2...3 каплі 3 % розчину НЦ. Ретельно їх змішували і накривали покривним скельцем. У полі зору мікроскопа ($n = 3$) вели підрахунок кількості сперматозоїдів (n_i), показник активності прямолінійно поступального руху яких був високим. Окремо рахували сперматозоїди з манежним (n_m) і коливним (n_k) способами руху. Результати досліджень обчислювали за формулою 2.2.:

(ф. 2.2.)

де P – рухливість сперматозоїдів у балах,

n_i – число сперматозоїдів з прямолінійним поступальним рухом,

10 – коефіцієнт перерахунку для визначення рухливості сперматозоїдів,

n – загальне число підрахованих сперматозоїдів ($n = n_i + n_m + n_k$).

З $n = 3$ визначали середню арифметичну величину (M) рухливості (P) сперматозоїдів.

2.2.5. Визначення кількості живих і мертвих сперматозоїдів

Визначення проводили світловим мікроскопом. На ретельно вимите, обезжирене впродовж 3 год у рівних об'ємах етилового спирту з ефіром, висушене і підігріте до 35...37 °С предметне скло наносили каплю сперми. До

сперми добавляли 2...3 каплі еозин-нігрозинової суміші, 2...3 с змішували з барвником і робили тонкі мазки ($n = 3$).

Виготовлені мазки висушували за 18...20 °С. Визначення кількості живих і мертвих сперматозоїдів проводили під імерсією з голубим або зеленим світлофільтром. У кожній пробі рахували 100 клітин. Окремо рахували кількість сперматозоїдів із зафарбованими (мертві) та незафарбованими (живі) головками. Сперматозоїди, головка яких була зафарбована частково, відносили до категорії мертвих.

Кількість мертвих клітин у спермі обчислювали за формулою 2.3.:



(ф. 2.3.)

де H_c – кількість мертвих сперматозоїдів (%),

C^+ – кількість зафарбованих головок,

C^- – кількість незафарбованих (світлих) головок.

У мірній колбі на 100 см³ завчасно готували еозин-нігрозинову суміш. Наливали 50...60 см³ 3 % розчину НЦ. В його об'ємі розчиняли 1,5 г еозину та 10 г нігрозину. Після повного розчинення барвників, об'єм рідини у колбі доводили розчином НЦ до мітки 100 см³. Із $n = 3$ визначали середньоарифметичну величину (M).

2.2.6. Визначення тривалості виживання сперматозоїдів

Для встановлення тривалості виживання сперматозоїдів кожні 24 год, після забору сперми, визначали рухливість клітин. Останнє визначення

проводили тоді, коли у полі зору мікроскопа були лише поодинокі рухливі сперматозоїди.

Час виживання сперматозоїдів (T_{nc}) обчислювали за формулою 2.4.:

(ф. 2.4.)

де T_{nc} – час виживання сперматозоїдів (год),

T_n – час від першого до останнього визначення (год),

T_{n-1} – час від першого до передостаннього визначення (год),

n – порядковий номер кожного чергового дослідження.

За кінцевий результат приймали визначену із $n = 3$ середню арифметичну величину (M).

2.2.7. Оцінювання стану структури сперматозоїдів

Характерними ознаками сперматозоїдів еякульованої, розрідженої, еквіліброваної та деконсервованої сперми є ступінь їх поліморфізму та деструкції акросоми й цитоплазматичної мембрани. Визначену величину відношень кількості клітин неоднакової форми можна використовувати для встановлення ступеня шкодочинного чи захисного впливу ендогенних факторів на статеві органи самця, а екзогенних – на сперматозоїди нативної та кріоконсервованої сперми.

У цьому зв'язку висока роздільна здатність електронного мікроскопа та розроблений, адаптований у лабораторну роботу і стандартизований спосіб оцінювання особливостей динаміки деструкції сперматозоїдів [152, 161] має суттєву перевагу над загальноприйнятими методиками й методами. Тому його

успішно застосували для визначення ступеня захисного впливу кріопротекторів та чинників етапів ТКС на цілісність структури акросоми й цитоплазматичної мембрани сперматозоїдів.

Виготовлення і монтаж плівок - підкладок з блендами. Для виготовлення плівок - підкладок 0,35 г полівінілформальдегіду (ПВФА) розчиняли у 100 см³ бідистильованого хлороформу. Плівку - підкладку формували на поверхні шліфованого скла, яке застосовують у електронній мікроскопії для виготовлення ультрамікротомних ножів. Скло ретельно мили ватним тампоном з милом. Залишки мила зі скла перший раз змивали водою з-під крану, другий – бідистильованою водою з промивалки. Вимите скло витирали сухим чистим рушником, а залишки пилу і ворсинок здували струменем повітря з гумової груші.

Підготовлене таким чином скло занурювали на 1/3 довжини у спеціальний закритий циліндр, який на 1/3 його висоти був заповнений 0,35 % розчином ПВФА. Через 15...20 с скло акуратно виймали з розчину і 10...15 с витримували у вільному від рідини просторі циліндра. За час витримання скла у випарах хлороформу на його поверхні утворюється тонка, майже непомітна неозброєним оком плівка - підкладка.

Для того, щоб плівку - підкладку зняти зі скла і перенести на воду периметр утвореного прямокутника акуратно різали скальпелем. Скло під кутом 45° обережно занурювали у хімічний стакан, який доверху заповнювали бідистильованою водою. Чекали до того часу коли вода, яка проникла під плівку (силами поверхневого натягу і поступового занурювання скла у воду), не зніме її зі скла. Відокремлена від скла плівка має вільно плавати на поверхні води. На плівці спеціальним пінцетом формували 5...7 рядів сіточок (бленд). У кожному ряду їх має бути три.

Щоб плівку з блендами перенести на предметне скло його нижню сторону обережно з'єднували з ближньою стороною виготовленого прямокутника і швидко, але не дуже різко, під кутом 45° скло занурювали у

воду. Плівка з сіточками рівномірно лягає на скло, яке висушували під скляним ковпаком і переносили у закриті контейнери для зберігання.

Виготовлення маточного і фіксуючого розчинів. Завчасно до запланованих досліджень у мірній колбі на 500 см^3 , готували спеціальний маточний розчин. У колбу наливали $200\ldots300\text{ см}^3$ бідистильованої води і розчиняли $14,714\text{ г}$ вероналу натрію ($\text{C}_8\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}_2\text{Na}$, медінал) та $9,714\text{ г}$ ацетату натрію ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot3\text{H}_2\text{O}$). Внесені у воду компоненти розчину розмішували скляною паличкою і, після їх повного розчинення, доливали бідистильовану воду до мітки 500 см^3 . Виготовлений маточний розчин зберігали у холодильнику за $2\ldots4\text{ }^\circ\text{C}$.

Під час досліджень з маточного розчину готували фіксуючий розчин, який використовували для фіксації сперматозоїдів. У скляний, чистий і темний, шліфований посуд місткістю $20\ldots30\text{ см}^3$ мірною піпеткою вливали $5,0\text{ см}^3$ маточного розчину, $5,0\text{ см}^3 - 0,1\text{ н HCl}$, $2,5\text{ см}^3$ бідистильованої води і $12,5\text{ см}^3 - 2\%$ розчину осмієвої кислоти (OsO_4). На $1,0\text{ см}^3$ фіксуючого розчину додавали 45 мг сахарози. За цих умов, кінцева концентрація іонів водню (pH) фіксуючого розчину становила $7,4$ [35].

Підготовка проб до досліджень. Від свіжоотриманих еякулятів, а також після їх розрідження, еквілібрації й деконсервації у центрифужну пробірку (флакон) мікропіпеткою відбирали $0,1\text{ см}^3$ сперми. До сперми доливали $2\ldots3\text{ см}^3$ фіксуючого розчину. Сперму з розчином витримували $20\ldots30\text{ хв}$ і впродовж 5 хв за 800 г відокремлювали зафіксовані клітини від фіксатора. Відцентрифуговану масу сперматозоїдів двічі промивали бідистильованою водою. Режим роботи центрифуги кожного разу був однаковим.

Оптимальну концентрацію клітин у пробах за допомогою світлового мікроскопа визначали візуально. У пробірки (флакони) поступово доливали необхідний об'єм бідистильованої води. Для нанесення проб сперми на бленди у флакони вводили спеціально заточену скляну паличку, якою суспензію клітин переносили на предметне скло. Кожну пробу наносили на три, окремо

розміщені сіточки. Варіанти досліду нумерували на склі. Інформацію про зміст і суть досліджень записували у лабораторний журнал.

Підготовлені таким чином проби обережно переносили під скляний ковпак. Після випаровування залишків води проби зберігали у спеціальних закритих контейнерах. Стан екзоструктури сперматозоїдів визначали у полі зору люмінесцентного екрана електронного мікроскопа.

Оцінювання поліморфізму сперматозоїдів. Для того, щоб визначити відношення різних форм клітин в еякулятах їх популяцію ділили на дві групи (рис. 2.2.).

У першу включали типові (нормальні), у другу – нетипові (аномальні) форми [161]. Характерною ознакою типових клітин є те, що вони, не зважаючи на шкодочинну дію ендо- та екзогенних факторів, зберігають нормальну форму будови головки, шийки, тіла і хвоста та цілісність структури їх акросоми й цитоплазматичної мембрани. Акросома таких сперматозоїдів щільно прилягає до головки, а цитоплазматична мембрана – до усіх ділянок клітини, зберігаючи чітко окреслену межу її зовнішньої поверхні.

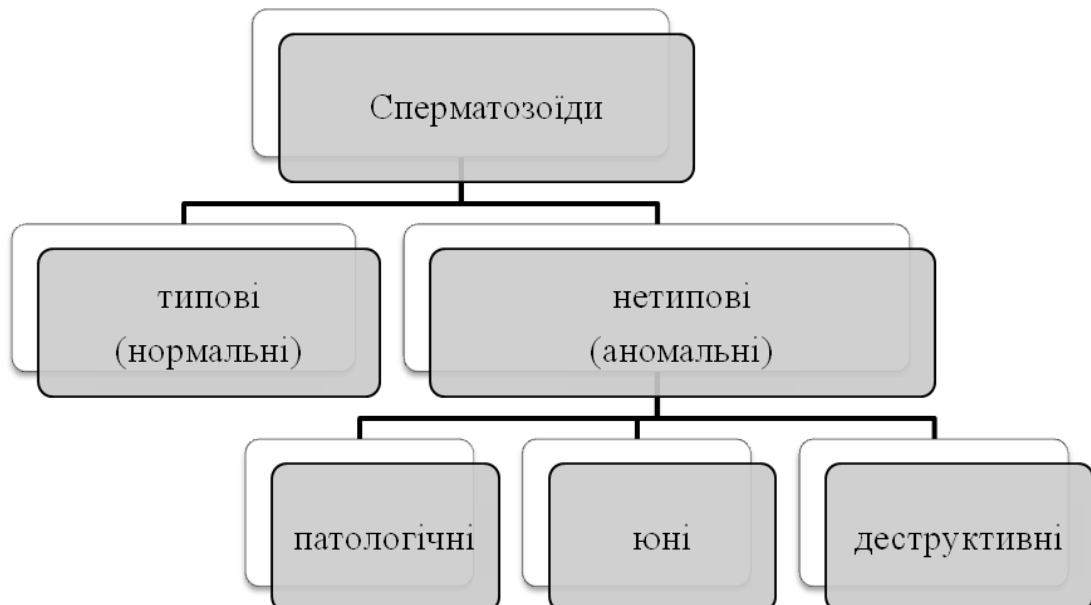


Рис. 2.2. Схема оцінювання ступеня поліморфізму сперматозоїдів у спермі.

Групу клітин нетипової форми ділили на три підгрупи: патологічні, юні, деструктивні. До підгрупи патологічних включали: гігантські, карликові, двотілі, двоголові клітини з особливими змінами форми головки, шийки, тіла і хвоста. Їх видовжена і звужена від апікального до базального краю головка – zdeформована в ширину і довжину або змінена на малу чи велику кулю, шийка – без плавного переходу до тіла, тіло – зменшене і товсте, або видовжене і тонке, хвіст – подвоєний, або редукований. Перераховані ознаки вказують на те, що наведені відхилення від норми будови статевих клітин – зумовлені спадковими хворобами або дією мутагенів на організм самців.

Друга підгрупа – юні або незрілі форми сперматозоїдів. Їх визначали за наявністю особливої цитоплазматичної капельки. В період дозрівання (формування запліднювальної здатності) клітин вона поступово пересувається від їх головки до хвоста.

До третьої підгрупи – відносили сперматозоїди з деструктивними змінами акросоми й цитоплазматичної мембрани. Ці клітини утворилися внаслідок прямої дії на них ендо- та екзогенних чинників. Їх акросома набухає і сповзає з головки. Головка – поступово вакуолізується і розпадається. Хвостова частина загинається, закручується в кільця різної форми (доволі часто у спіраль), тіло і хвіст – розпадаються на оскові нитки.

Оцінювання деструктивних змін. Визначення відношень типових і нетипових форм клітин в еякулятах здійснювали у полі зору електронного мікроскопа. Розміщений на предметному столику патрон з об'єктом штангами кульових ручок рухали так, щоб висвітлені на екрані ряди квадратів бленду пересувалися з його лівої сторони на праву. Після досягнення крайнього квадрата переходили на нижній ряд і продовжували переміщатися у протилежну сторону. При цьому лейкоцитарним лічильником три рази підряд рахували 100 клітин типової та нетипової форми. За встановленою середньою величиною знаходили, виражене відсотками відношення їх кількості у пробах.

Визначали різницю прямої й сумарної дії чинників ТКС на клітину, яка дозволяє знайти ступінь (частку) деструктивно впливу кожного наступного

етапу ТКС щодо попереднього. Для цього різницю втрачених клітин типової форми ($x_1 - x_4$) приймали за 100 %, а після розрідження ($x_1 - x_2$), еквілібрації ($x_2 - x_3$) та деконсервації ($x_3 - x_4$) – за x . Із складених пропорцій знаходили ступінь впливу на клітину чинників кожного наступного етапу ТКС щодо попереднього.

Аналогічно визначали ступінь сумарного впливу чинників етапів ТКС. Для цього початкову кількість клітин типової форми (x_1) приймали за 100 %, а деструктивних ($x_1 - x_4$) – за невідомий відсоток x . Кінцевим результатом, кожного окремо взятого показника ($n = 3$), вважали середньоарифметичну величину (M).

2.2.8. Визначення параметрів концентрації Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у спермальній плазмі та сперматозоїдах

Вивчення особливостей переміщення іонів у відкритих системах типу “середовище - клітина” на етапах ТКС становить певний теоретичний і практичний інтерес. З цією метою розробили методику, стандартизовані прийоми якої дозволяють визначати зміни концентрації Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , що відбуваються у відкритих системах типу “середовище - сперматозоїди”.

Концентрацію іонів лужних металів визначали за допомогою методу полуменевої фотометрії (Flafo - 4) окремо у сперматозоїдах та спермальній плазмі. Розроблена методика дозволяє реєструвати: стан рівноваги вмісту іонів, аналізувати особливості їх переміщення (спосіб руху) на окремо взятих етапах ТКС.

Приготування розчинів. Для приготування запасних і основних розчинів, а також концентраційних рядів робочих розчинів солі CaCO_3 , NaCl і KCl марки “ЧДА” або “ХЧ” висушували до постійної маси у сушильній шафі (термостаті) за 110...120 °С. Контроль за зміною їх маси здійснювали аналітичними вагами. Висушені солі зберігали у скляному, темному, шліфованому посуді без доступу вологи.

1. Запасні розчини. Їх готували з наважки, маса якої для CaCO_3 становила 2,497, для NaCl – 1,907, а для KCl – 2,542 г. Кожну наважку солі засипали у колбу місткістю $1,0 \text{ дм}^3$.

Солі NaCl і KCl розчиняли в незначному об'ємі бідистильованої води; CaCO_3 – в $20 \text{ см}^3 \text{ HCl}$. До розчину солей у відношенні 1:1 доливали бідистильовану воду. Об'єм виготовлених розчинів доводили водою до мітки $1,0 \text{ дм}^3$. Кінцева концентрація Ca^{2+} , Na^+ , K^+ у розчинах становила 1000 мг/дм^3 .

2. Основні розчини. З колб місткістю $1,0 \text{ дм}^3$ відбирали 50 см^3 запасного розчину. Відібраний об'єм розчину переносили у колби місткістю 500 см^3 і до мітки $0,5 \text{ дм}^3$ доливали бідистильовану воду. Після проведених маніпуляцій концентрація Ca^{2+} , Na^+ , K^+ основних розчинів становила 100 мг/дм^3 .

3. Робочі розчини. З основних розчинів готували серію робочих розчинів. Концентрація Ca^{2+} , Na^+ , K^+ у них становила 50, 20, 10, 5, 2 і 1 мг/дм^3 (табл. 2.3.).

Режим роботи приладу. Для визначення концентрації Ca^{2+} , Na^+ , K^+ у робочих розчинах і дослідних пробах використовували металічні інтерференційні світлофільтри (Ca^{2+} – 621, Na^+ – 588, K^+ – 767 нм). Показник витрат повітря фіксували на рівні 250, ацетилену – 40, пропан-бутанової суміші – 13...18 $\text{дм}^3/\text{год}$. Полуменевий фотометр вмикали в електромережу і, через 10...15 хв після стабілізації роботи вимірювальної системи, приступали до юстування шкали приладу.

Капіляр подачі розчину вводили у стакан з бідистильованою водою і запалювали газовий пальник. Стрілку мікроамперметра виводили на нульову позначку. Положення ручки для переведення діапазонів чутливості приладу (0...10) пов'язане з концентрацією Ca^{2+} , Na^+ , K^+ у робочих розчинах. Максимальне значення шкали мікроамперметра для найвищої концентрації Ca^{2+} становить 8, Na^+ – 120, K^+ – 100 поділок.

Таблиця 2.3.

Схема приготування робочих розчинів

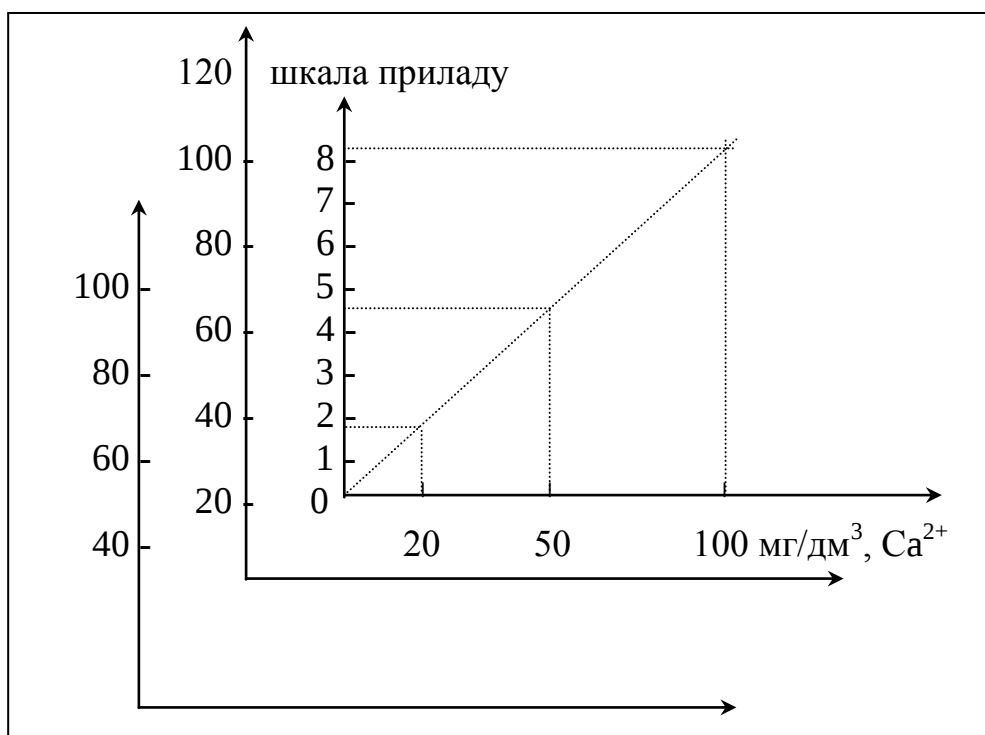
Робочі	Об'єм	Об'єм	Концентрація
--------	-------	-------	--------------

розчини (№)	основного розчину (см ³)	бідистиляту (см ³)	робочих розчинів (мг/дм ³)
1	250	250	50
2	100	400	20
3	50	450	10
4	25	475	5
5	10	490	2
6	5	495	1

Примітка. Робочі розчини не слід зберігати тривалий час. Розчинені солі випадають в осад і змінюють концентрацію іонів. Кристали осаду забивають капіляр подачі розчину у розпилювач приладу. За появи осаду в розчинах старі еталони замінюють новими.

Калібрувальні криві будували за визначеними у робочих розчинах концентраціями Ca^{2+} , Na^+ , K^+ . На графік наносили одержані з двох вимірювань середні показники шкали приладу. Перше вимірювання проводили від розчину № 1 до № 6, друге – від розчину № 6 до № 1. За показами шкали приладу будували калібрувальні криві.

Побудова калібрувальної кривої. Розмірність шкали мікроамперметра, розмах якої для Ca^{2+} становить 0...8, Na^+ – 0...120, K^+ – 0...100 поділок, наносили на вісь ординат (y), а на вісь абсцис (x) – покази концентрації Ca^{2+} , Na^+ , K^+ у діапазоні 0...100 мг/дм³. За потреби крайню позначку (100 мг/дм³) максимальної концентрації Ca^{2+} , Na^+ , K^+ у розчинах замінювали на: 50; 20; 10 чи 5 мг/дм³, а саме: 100, 50, 20, 0 на 50, 20, 10, 0; або на 20, 10, 5, 0; або на 10, 5, 2, 0, або на 5, 2, 1, 0 (рис. 2.3.).



20 -	0	20	50	100 мг/дм ³ , Na ⁺
0	20	50	100 мг/дм ³ , K ⁺	
	10	20	50	
	5	10	20	
	2	5	10	
	1	2	5	

Рис. 2.3. Схема побудови калібрувальних кривих для визначення концентрації Ca²⁺, Na⁺, K⁺ у дослідних і контрольних пробах

Визначення концентрації Ca²⁺, Na⁺, K⁺. Від свіжоотриманих еякулятів відбирали 2,3 см³ сперми. Відібраний об'єм сперми ділили на дві частини (0,6 і 1,7 см³). Першу порцію (0,6 см³) ділили також на дві частини (0,1 і 0,5 см³): 0,1 см³ використовували для визначення концентрації сперматозоїдів; 0,5 см³ – для визначення концентрації Ca²⁺, Na⁺, K⁺. Порцію сперми об'ємом 1,7 см³ у відношенні 1:1 розріджували полікомпонентним дослідним, контрольним розріджувачами або монокомпонентними ВРК заданої концентрації і витримували у холодильнику 4 год за 2...4 °С (період еквілібрації сперми).

Свіжоотриману нерозріджену сперму об'ємом 0,5 см³ переносили у центрифужну пробірку (флакони) і, для фіксації білків акросоми та цитоплазматичної мембрани сперматозоїдів (поперечне зшивання молекул), добавляли одну каплю 2 % розчину глутаральдегіду. Фіксатор змішували зі спермою, витримували 10...15 хв і центрифугували 5 хв за 800 g. Після зупинки центрифуги спермальну плазму відокремлювали від клітин.

Автоматичним дозатором рідин А-2 у центрифужні пробірки (флакони) доливали 4,5 см³ бідистильованої води. Відцентрифуговані клітини гомогенізували до дрібнодисперсної однорідної суспензії, спермальну плазму ретельно перемішували і у сперматозоїдах та відокремленому середовищі визначали концентрацію Ca²⁺. Результати вимірювань заносили у лабораторний журнал.

Для визначення концентрації Na^+ , K^+ до суспензії клітин додавали 5; до спермальної плазми – 10 см^3 бідистильованої води. У додатково розріджених пробах спочатку визначали концентрацію Na^+ , а згодом – K^+ . Якщо стрілка мікроамперметра виходила за межу максимального значення шкали приладу ($\text{Na}^+ - 120$, $\text{K}^+ - 100$), то до проб поступово порціями доливали по 5 см^3 бідистильованої води.

Кінцеву концентрацію іонів у дослідних пробах знаходили на графіку калібрувальної кривої, яку будували за допомогою визначених на шкалі приладу показів відомих концентрацій робочих розчинів. Для стандартизації експериментальних даних за міжнародною системою одиниць (СИ), визначену у мг/дм^3 концентрацію іонів перерахували у ммоль/дм^3 (мМ), а саме: враховуючи ступінь розрідження проб, результати вимірювань перемножували на коефіцієнти перерахунку ($\text{Ca}^{2+} - 0,02495$, $\text{K}^+ - 0,02597$, $\text{Na}^+ - 0,0435$).

При встановленні ступеня впливу чинників етапу еквілібрації сперми на гомеостаз іонів у системі “середовище - клітина” від залишеного на 4 год в холодильнику об’єму ($2,4 \text{ см}^3$) відбирали $1,0 \text{ см}^3$ розрідженої сперми. Операції з визначення концентрації Ca^{2+} , Na^+ , K^+ у плазмі та сперматозоїдах повторювали за описаною вище схемою. Світловим мікроскопом контролювали рухливість клітин у пробах.

Вплив чинників етапу деконсервації на гомеостаз іонів визначали, заморожуючи $1,0 \text{ см}^3$ еквіліброваної сперми на фторопластовій пластині. Пластину ставили над ванною з рідким азотом. Заморожували сперму необлицьованими гранулами об’ємом 0,1, 0,2 або $0,5 \text{ см}^3$ отримуючи 10, 5 або 2 гранули відповідно. Гранули зберігали не менше 2 діб у термосах Дюара, заповнених рідким азотом (-196°C); розморозували в $1,0 \text{ см}^3$ 2,8 % розчину НЦ за 37°C . Після зникнення останнього кристалика льоду у пробах визначали концентрацію Ca^{2+} , Na^+ , K^+ та рухливість сперматозоїдів.

2.2.9. Встановлення способу переміщення іонів у системі “середовище-клітина”

Сучасні кріобіологи розробили багато ЗС, які використовують у практичній роботі для збереження повноцінності структури й функцій сперматозоїдів. Але після деконсервації гранул у спермі залишається лише 30...35 % сперматозоїдів здатних запліднити яйцеклітину. Тому базовою метою розробленого способу став пошук причин, які не дозволяють звести до мінімуму негативну дію кріопротекторів та чинників ТКС на сперматозоїди.

Суть розробленого способу полягає у тому, що трансмембранні зміни концентрації й відношень іонів солей макро- та мікроелементів, молекул органічних речовин, що відбуваються у відкритих системах типу “середовище - клітина” на кожному етапі ТКС за дії екзогенних чинників, можна детально аналізувати визначеними абсолютними і відносними показниками.

Для вивчення особливостей захисного впливу екзогенних чинників на стан структури й функцій сперматозоїдів, як модельні системи використали монокомпонентні ВРК та полікомпонентні ЗС. Динаміку рівноваги вмісту іонів оцінювали у три етапи. На першому визначали параметри концентрації Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} у сперматозоїдах свіжоотриманої, розрідженої, еквіліброваної й деконсервованої сперми. На другому – різницю змін концентрації іонів ($\pm \Delta$, мМ), яка характеризує процеси, що відбуваються після кожного етапу ТКС. На третьому – частку змін ($\pm \Delta$, %) від сумарної дії усіх чинників щодо дії чинників кожного етапу ТКС та параметрів початкової концентрації іонів у сперматозоїдах свіжоотриманої сперми.

Знаком (+) позначали вектор руху іонів з середовища у клітини; знаком (–) – з клітин у середовище. Визначені абсолютні (різниця) та відносні (частка) зміни концентрації іонів неорганічних та молекул органічних речовин характеризують особливості їх кількісного трансмембранного переміщення у відкритих системах типу “середовище - клітина”.

2.2.10. Методологія оцінювання стану структури й функцій сперматозоїдів

Об'єктивність оцінювання ступеня захисної дії екзогенних чинників на стан структури й функцій сперматозоїдів потребує детального вивчення змін, що відбуваються у системах типу “середовище - клітина”. Тому використану методологію досліджень з вивчення впливу монокомпонентних ВРК, полікомпонентних ЗС та чинників ТКС спрямували на з'ясування двох аспектів змін повноцінності стану структури й функцій сперматозоїдів.

Мета першого – детальне вивчення змін параметрів концентрації та її відношень між парами іонів [151]; другого – змін екзоструктури (акросома, цитоплазматична мембрана) й функцій (рухливість, виживання, запліднювальна здатність тощо) сперматозоїдів типової форми [142, 161].

За визначеними показниками абсолютних ($\pm \Delta$, мМ) і відносних ($\pm \Delta$, %) змін концентрації іонів встановлювали особливості впливу ВРК, ЗС та етапів ТКС на гомеостаз іонів у системі “середовище - клітина”. Наведені у таблиці 2.4. зміни концентрації іонів свідчать, що у сперматозоїдах після дії чинників ТКС (x_1, x_2, x_3) величина концентрації Ca^{2+} $x_1 < x_2 < x_3$. За цих обставин вона поступово зростає від 1,2 до 1,7, але K^+ та Na^+ – $x_1 > x_2 = x_3$. Величина визначених змін поступово знижується від 15 до 14 та від 19 до 15 мМ.

Таблиця 2.4.

Параметри концентрації Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у сперматозоїдах (М, мМ)

Об'єкт досліджень	Іони	Сперма нерозріджена	Етапи ТКС		
			розрідження	еквілібрація	деконсервація
Сперматозоїди	Ca^{2+}	1,2	1,5	1,7	0,9
	K^+	15	14	14	4
	Na^+	19	15	15	41
		(x_1)	(x_2)	(x_3)	(x_4)

Примітка. (x_1, x_2, x_3, x_4) – величина показника концентрації іонів у сперматозоїдах свіжоотриманої (нерозріджена), розрідженої, еквіліброваної, деконсервованої сперми.

Після етапу деконсервації (x_4) гранул концентрація Ca^{2+} у сперматозоїдах знижується від 1,7 до 0,9, K^+ – від 14 до 4 мМ, що в 1,9 і 3,5 разів менше, але

Na^+ – зростає від 15 до 41 мМ, що в 2,7 разу більше, ніж після дії чинників етапу еквілібрації сперми.

а. Визначення різниці змін ($\pm \Delta$, мМ) концентрації іонів. Визначений показник дії чинників першого етапу ТКС вказує на те, що після розрідження сперми ($x_2 - x_1$) у системі типу “середовище - клітина” відбувається антипортне переміщення Ca^{2+} (+ 0,3) у клітини, щодо K^+ (– 1) і Na^+ (– 4 мМ) з них (табл. 2.5.).

Дія чинників етапу еквілібрації ($x_3 - x_2$) змінює концентрацію Ca^{2+} у сперматозоїдах (+ 0,2 мМ), але K^+ і Na^+ – залишає без змін. Після дії чинників етапу деконсервації гранул вектор руху іонів у системі “середовище - клітина” – інший.

Таблиця 2.5.

Різниця абсолютних змін концентрації іонів у сперматозоїдах (М, $\pm \Delta$ мМ)

Об'єкт досліджень	Іони	Етапи ТКС			
		Після			Від одержання до деконсервації
		розрідження	еквілібрації	деконсервації	
Сперматозоїди	Ca^{2+}	+ 0,3	+ 0,2	– 0,8	– 0,4
	K^+	– 1	– 0	– 10	– 11
	Na^+	– 4	0	+ 26	+ 22
		$\Delta_p^a = x_2 - x_1$	$\Delta_e^a = x_3 - x_2$	$\Delta_d^a = x_4 - x_3$	$\Delta_t^a = x_4 - x_1$

Примітка. – показник різниці абсолютних змін параметрів концентрації іонів у сперматозоїдах: – після розрідження, – еквілібрації, – деконсервації, – за повний цикл ТКС (від одержання сперми до деконсервації гранул). (+) – вектор руху іонів у клітину, (–) – з клітини.

Показник різниці змін концентрації Na^+ у клітинах стає на + 26 мМ більший, але Ca^{2+} і K^+ – на – 0,8 і – 10 мМ відповідно менший. Це означає, що визначений за умов розрідження сперми антипортний рух Ca^{2+} , щодо K^+ і Na^+ після деконсервації сперми змінюється на антипортний Na^+ , щодо Ca^{2+} і K^+ . Визначена, за період від одержання сперми до деконсервації гранул ($x_4 - x_1$),

різниця суми змін концентрації Ca^{2+} , K^+ , Na^+ становить відповідно: $-0,4$; -11 ; $+22$ мМ.

б. Визначення частки змін ($\pm \Delta$, %) концентрації іонів. Аналіз визначеної частки змін концентрації іонів, які відбуваються у системі “середовище - клітина” (табл. 2.6.), вказує на те, що після розрідження сперми відносні зміни концентрації Ca^{2+} у сперматозоїдах становлять $+75$ %, але K^+ і Na^+ -9 та -18 %.

Під час етапу еквілібрації розрідженої сперми зміни концентрації іонів відбуваються за цією ж схемою. Проте, визначені відсотки змін, – мають іншу величину: Ca^{2+} $+50$ %, а K^+ і Na^+ – залишаються без змін. Найбільші зміни гомеостазу іонів встановлені після дії чинників останнього етапу ТКС.

Однак, якщо у сперматозоїдах деконсервованої сперми частка змін вмісту Ca^{2+} становить -200 % щодо показників розрідженої ($+75$ %), еквіліброваної ($+50$ %), що в 3 і 4 рази більше, то K^+ (-91 % проти -9 і 0 %) і Na^+ ($+118$ проти -18 і 0 %) відповідно 10...91 та 7...118 разів більше. Зміни, що відбуваються у сперматозоїдах за увесь процес ТКС, – також різні. Частка змін їх вмісту має неоднакові величини і $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Ca}^{2+}$ (116, 73, 33 % відповідно) та різний вектор ((+) Na^+ , (–) K^+ , (–) Ca^{2+}) руху іонів.

Таблиця 2.6.

Частка відносних змін концентрації іонів у сперматозоїдах (М, $\pm \Delta$ %)

Об'єкт досліджень	Іони	Етапи ТКС			від одержання до деконсервації
		розрідження	еквілібрація	деконсервація	
Сперма-Тозоїди	Ca^{2+}	$+75$	$+50$	-200	-33
	K^+	-9	0	-91	-73
	Na^+	-18	0	$+118$	$+116$

Примітка. – показник частки відносних змін концентрації іонів у сперматозоїдах:

– щодо дії чинників етапу розрідження, – еквілібрації, – деконсервації, – за повний цикл ТКС щодо нативної сперми; (+) – вектор руху іонів у клітину, (–) – з клітини.

в. Визначення відношень концентрації іонів. Детальне оцінювання особливостей змін гомеостазу іонів у відкритих системах типу “середовище - клітина”, які відбуваються за дії чинників ТКС, може забезпечити аналіз змін концентрації Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у середовищі й сперматозоїдах та її відношень між різно- ($\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$, $\text{K}^+:\text{Ca}^{2+}$, $\text{Na}^+:\text{K}^+$) і однойменними ($\text{Ca}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$, $\text{K}^+:\text{K}^+$, $\text{Na}^+:\text{Na}^+$) парами іонів.

Якщо виходити з того, що ліміт початкової концентрації Ca^{2+} у середовищі становить 7...8, у сперматозоїдах – 1,6...1,7 мМ; K^+ – 11...55 і 6...14 мМ, а Na^+ – 52...80 і 12...19 мМ (табл. 2.7), то зміни її відношень у сперматозоїдах та між плазмою і сперматозоїдами розрідженої, еквіліброваної, деконсервованої сперми є такими. Відношення різнойменних пар Na^+ і $\text{K}^+:\text{Ca}^{2+}$ у сперматозоїдах за дії чинників етапу розрідження стають на 2...3 частини вмісту меншими, але $\text{Na}^+:\text{K}^+$ – на 1...2 більшими.

Таблиця 2.7.

Ліміти концентрації іонів у плазмі та сперматозоїдах (М, мМ)

Об'єкт Досліджень	Ліміти (min...max)		
	Ca^{2+}	K^+	Na^+
Середовище	7...8	11...55	52...80
Сперматозоїди	1,6...1,7	6...14	12...19

За 4 год дії чинників етапу еквілібрації сперми дисбаланс відношень концентрацій Na^+ і $\text{K}^+:\text{Ca}^{2+}$ у сперматозоїдах вирівнюється. Показник його змін становить 1...2 частини вмісту, але $\text{Na}^+:\text{K}^+$ – залишається без змін (табл. 2.8.). За деконсервації гранул показник відношень концентрації $\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$ і $\text{Na}^+:\text{K}^+$ – змінюється в 2...8 разів. Але, якщо відношення концентрації, щодо етапу еквілібрації сперми більше на 4...62 частин вмісту $\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$ і $\text{Na}^+:\text{K}^+$, то $\text{K}^+:\text{Ca}^{2+}$ – майже не змінюється.

Таблиця 2.8.

Ліміти відношень концентрації іонів у сперматозоїдах та

між середовищем і сперматозоїдами (М, ч. в.)

Сперма	Об'єкт досліджень	Пари іонів					
		різнойменні			однойменні		
		$\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$	$\text{K}^+:\text{Ca}^{2+}$	$\text{Na}^+:\text{K}^+$	$\text{Ca}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$	$\text{K}^+:\text{K}^+$	$\text{Na}^+:\text{Na}^+$
Н	Сперматозоїди	8...11:1	4...8:1	1...2:1	—	—	—
Р		6... 9:1	2...5:1	2...3:1	—	—	—
Е		7...11:1	2...6:1	2...3:1	—	—	—
Д		11...73:1	2...5:1	2...24:1	—	—	—
Н	Середовище: сперматозоїди	35...41:1	7...32:1	7...10:1	4...5:1	2...4:1	3...5:1
Р		36...69:1	9...21:1	15...16:1	5...8:1	4...5:1	4...7:1
Е		40...79:1	9...25:1	7...17:1	4...8:1	2...5:1	5...8:1
Д		23...100:1	7...53:1	6...38:1	1...3:1	1...16:1	4...17:1

Примітка. Н – нерозріджена, Р – розріджена, Е – еквілібрована, Д – деконсервована сперма.

Наступний етап аналізу особливостей дисбалансу концентрації іонів спрямували на визначення змін, що відбуваються у системі “середовище - клітина”. З цього приводу слід зазначити, що відношення концентрації $\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$ між плазмою і сперматозоїдами нерозрідженої сперми в 4; $\text{K}^+:\text{Ca}^{2+}$ – в 2...4; $\text{Na}^+:\text{K}^+$ – в 5...7 разів більше, ніж у сперматозоїдах. Але наведена різниця відношень різнойменних пар іонів деконсервованої сперми – інша. Якщо відношення концентрації $\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$ і $\text{Na}^+:\text{K}^+$ між плазмою (середовище) і сперматозоїдами тільки в 1...2 разу більше, то $\text{K}^+:\text{Ca}^{2+}$ – в 4...11 разів більше, ніж у сперматозоїдах.

Зміни гомеостазу іонів стосуються також відношень концентрації однойменних пар іонів. Чинники етапу розрідження сперми в 1...2 рази збільшують числовий вираз відношень $\text{Ca}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$, $\text{K}^+:\text{K}^+$ і $\text{Na}^+:\text{Na}^+$. Встановлена на етапі еквілібрації сперми рівновага вмісту іонів не зазнає суттєвих змін. Але, за умов деконсервації гранул, показник відношень концентрації $\text{Ca}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$ в 3...4 рази менший, а $\text{K}^+:\text{K}^+$ і $\text{Na}^+:\text{Na}^+$ в 1...3 рази більший, ніж між плазмою і сперматозоїдами еквіліброваної сперми. Це означає, що переміщені із середовища у сперматозоїди K^+ і Na^+ витісняють з клітин Ca^{2+} .

Отже, визначені відношення концентрації різно- та однойменних пар іонів між плазмою (середовищем) і сперматозоїдами свідчать:

- зміни гомеостазу іонів лужних металів відкритих систем типу “середовище - клітина” пов’язані зі ступенем захисної дії кріопротекторів, ЗС та чинників етапів ТКС на сперматозоїди;
- процес вирівнювання дисбалансу концентрації іонів контролюють неоднаково асиметричні числові вирази величини її відношень;
- реакція клітин на дію екзогенних чинників виражена симпортним і антипортним способами руху іонів;
- різниця (Δ) відношень концентрації різнойменних пар іонів у сперматозоїдах та однойменних – між середовищем і сперматозоїдами, залежно від дії чинників (ВРК, ЗС), етапів розрідження й еквілібрації сперми, – однакова ($\Delta = \pm 1...3$ частини), але різнойменних між середовищем і сперматозоїдами ($\Delta = \pm 1...11$ частини), що в 3,6 разу більше, ніж у сперматозоїдах;
- визначена для сперматозоїдів та відкритих систем типу “середовище - сперматозоїди” різниця відношень концентрації різнойменних пар іонів за дії чинників етапу деконсервації сперми становить: $\pm 1...62$ і $1...28$ частин їх вмісту; однойменних – $\pm 1...11$, що в 21, 3 і 6 разів більше, ніж за дії чинників етапу еквілібрації сперми;
- антипортний рух Na^+ щодо Ca^{2+} і K^+ ініціює перебіг фізичних і біохімічних процесів, дія яких ініціює перехід сперматозоїдів із пасивного стану анабіозу в активний стан їх поступального, прямолінійного руху.

2. Особливості впливу чинників ТКС на екзоструктуру сперматозоїдів типової форми. Особливості деструктивного впливу чинників ТКС на клітину ілюструє приклад визначених змін акросоми й цитоплазматичної мембрани сперматозоїдів від етапу одержання сперми до етапу її деконсервації, а саме: (x_1) – свіжоотримана, (x_2) – розріджена, (x_3) – еквілібрована, (x_4) – деконсервована (табл. 2.9.).

Таблиця 2.9.

Співвідношення форм сперматозоїдів у спермі (%)

Сперма	Сперматозоїди			
	типові	Нетипові		
		патологічні	Юні	Деструктивні
Свіжоотримана, (x ₁)	80	7	3	10
Розріджена, (x ₂)	76	7	3	14
Еквілібрована, (x ₃)	63	7	3	27
Деконсервована, (x ₄)	36	7	–	57

Примітка. x₁, x₂, x₃, x₄ - відсоток типових і нетипових сперматозоїдів у свіжоотриманій, розрідженій, еквіліброваній та деконсервованій спермі.

Кількість типових форм сперматозоїдів в еякулятах свіжоотриманої сперми високої якості становить 80, патологічних – 7, юних – 3, деструктивних – 10 %. Після дії чинників етапів ТКС у ряду розрідження-еквілібрація-деконсервація кількість клітин типової форми становить 76; 63; 36 %, деструктивної – 14; 27; 57 %, патологічної – залишається на рівні 7 %. Після деконсервації гранул “цитоплазматична капелька” юних сперматозоїдів зникає.

а. Визначення різниці шкодочинного впливу. Негативна дія чинників етапів ТКС на стан структури акросоми й цитоплазматичної мембрани клітин типової форми поступово зростає від етапу розрідження сперми до етапу деконсервації гранул. За прямої, деструктивної дії чинників етапів ТКС ліміт різниці втрат ($\Delta^p_{p...т}$, %) сперматозоїдів вказаної форми становить 4...44 % (табл. 2.10.).

Таблиця 2.10.

Різниця втрат сперматозоїдів типової форми,()

Об'єкт досліджень	Етапи ТКС			від одержання до деконсервації
	розрідження	еквілібрація	деконсервація	
Типові	–4	–13	–27	–44
сперматозоїди				

Примітка. $\Delta_{p...т}$, $\Delta_{p...т}$, $\Delta_{p...т}$ – показник різниці абсолютних втрат сперматозоїдів типової форми за дії умов етапів розрідження, еквілібрації, днконсервації та їх суми.

б. Визначення частки шкочинного впливу. Частка втрат ($\Delta_{p...т}^ч$, %) сперматозоїдів типової форми в 1,3...2,3 разу більша, ніж показник різниці їх виявлених змін. Після дії чинників кожного етапу ТКС частка втрачених сперматозоїдів типової форми становить – 9; – 29; – 61 і – 55 % (табл. 2.11.).

Таблиця 2.11.

Частка втрат сперматозоїдів типової форми ()

Об'єкт досліджень	Етапи ТКС		
	розрідження	еквілібрація	деконсер
Типові сперматозоїди	–9	–29	

Примітка. $\Delta_{p...т}$, $\Delta_{p...т}$, $\Delta_{p...т}$ – показник частки відносних втрат сперматозоїдів типової форми кожного наступного етапу ТКС щодо попереднього та суми втрат щодо їх стану в еякулятах нативної сперми.

Визначені параметри змін стану структури й функцій сперматозоїдів, які відбуваються у системі “середовище - клітина” за дії чинників ТКС, свідчать, що в ряду: розрідження-еквілібрація-деконсервація та за дії суми чинників ТКС екзоструктура акросоми і цитоплазматичної мембрани 9, 29, 61, 55 % сперматозоїдів типової форми зазнає деструктивних змін.

Отже, визначені параметри змін гомеостазу іонів і стану екзоструктури сперматозоїдів, які відбуваються у відкритих системах типу “середовище - клітина” та сформульовані висновки, дають підстави вважати, що розроблену нами методологію аналізу виявлених змін можна успішно використовувати для вивчення особливостей механізму захисного і/або негативного впливу

екзогенних чинників (ВРК, ЗС, ТКС) на стан структури й функцій сперматозоїдів.

2.2.11. Визначення активності Ca^{2+} - та Na^{+} -залежних АТФ-гідролазних систем у сперматозоїдах

Визначення концентрації білка (ДСТУ UA, ДР № 010080005645). В основу методу Лоурі (1951) закладено реакцію з реактивом Фоліна-Чіокальтеу. Активним компонентом реактиву є комплексні сполуки “молібдат-вольфрамат-фосфорної кислоти”. Під час реакції утворюється забарвлений розчин, інтенсивність якого зумовлена біуретовою реакцією. Комплексні сполуки реактиву відновлюються циклічними амінокислотами, що входять до складу макромолекул білків.

Для проведення досліджень користувалися набором стандартних реактивів: Реактив № 1. (10 % розчин Na_2CO_3 на 0,5 М розчині NaOH (50 см³)). Реактив № 2. (0,5 % розчин $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5 см³). Стандартний (2 мг/см³) розчин АСКБ (5 см³)). Реактив Фоліна-Чіокальтеу (суміш 100 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 700 см³ H_2O , 50 см³ 55 % фосфорної кислоти і 100 см³ концентрованої HCl , яку кип'ятять впродовж 10 год). Для конденсації пари розчину користувалися скляним холодильником. До суміші додавали 150 г вуглекислого літію (Li_2CO_3), 50 см³ H_2O і 3...4 краплі бром. Надлишок бром із суміші видаляли кип'ятінням впродовж 15 хв без холодильника. Суміш охолоджували, а об'єм реактиву доводили до 1000 см³ і фільтрували. Набір виготовлених реактивів розрахований на 100 визначень.

До 0,4 см³ розчину, ліміт концентрації білка у якому становив 0,05...0,5 мг/см³ (0,02...0,2 мг/пробу), додавали 2 см³ робочого розчину (табл. 2.12.). Робочий розчин готували у день визначення. До одного об'єму реактиву № 2 доливали 10 об'ємів реактиву № 1 і 40 об'ємів дистильованої води. Суміш реактивів перемішували і, за 18...20 °С, витримували 10 хв. Додавали 0,2 см³ реактиву Фоліна-Чіокальтеу і через 30 хв перемішували.

Схема приготування робочих розчинів

№ пробірки	Стандартний розчин АСКБ (см ³)	Дистильована вода (см ³)	Концентрація АСКБ (мг/см ³)
1	0,1	3,9	0,05
2	0,2	3,8	0,10
3	0,3	3,7	0,15
4	0,4	3,6	0,20
5	0,5	3,5	0,25
6	0,8	3,2	0,40
7	1,0	3,0	0,50

Від кожного розчину з різною концентрацією білка відбирали 0,4 см³ об'єму проби і послідовно, у вище наведених кількостях, додавали необхідні реагенти. Проби колориметрували спектрофотометром у кюветах з однаковою (10 мм) товщиною шару дослідної рідини. Довжина хвилі 750 нм проти контролю. За визначеними даними будували калібрувальний графік. На осі абсцис (x) відкладали відомі концентрації розчину білка (мг/см³); на осі ординат (y) – покази приладу.

Визначення концентрації фосфору (ДСТУ UA, ДР № 010080005646). Молібденовокислий амоній має властивість переводити фосфати у комплексні сполуки, які відновлюють ейконогеном. Інтенсивність синього забарвлення, яка утворена молібденовою синькою, служить для колориметричного порівняння із стандартним розчином калію фосфорнокислого однозаміщеного.

Проведення досліджень. Основний розчин ейконогену готували розчиняючи 15 г NaHSO₃ і 5 г Na₂SO₃ в 50 см³ дистильованої води, додавали 0,25 г ейконогену і до мітки 100 см³ доливали дистильовану воду. Розчин зберігали у темному хімічному посуді. Перед використанням до одної частини розчину додавали 4 частини дистильованої води. Стандартний розчин калію фосфорнокислого однозаміщеного готували розчиняючи у мірній колбі 383,3 мг солі KН₂РO₄ в 20 см³ 0,1 н Н₂SO₄. Виготовлений розчин солі доводили

дистильованою водою до мітки 1000 см^3 , який в 1 см^3 об'єму розчину містить $0,2\text{ мг Р}_2\text{О}_5$.

Визначення концентрації неорганічного фосфору. До 2 см^3 $0,85\%$ розчину NaCl у центрифужну пробірку додавали 1 см^3 свіжоотриманої сперми і 1 см^3 22% розчину кислоти трихлороцтової (ТХО). Утворену суміш ретельно розмішували і через 10 хв центрифугували. До відокремленої рідкої частини вносили 2 см^3 у відношенні $1:1$ $2,5\%$ водного розчину молібденовокислого амонію і $0,1\text{ н}$ розчину сірчаної кислоти. Розчин ейконогену ставили у водяну баню і витримували 5 хв за $37\text{ }^\circ\text{C}$. Паралельно у мірну колбу на 25 см^3 вливали 2 см^3 стандартного розчину калію фосфорнокислого однозаміщеного, $2,5\text{ см}^3$ 22% ТХО, 10 см^3 суміші рівних об'ємів $2,5\%$ розчину молібденовокислого амонію та $2,5\text{ см}^3$ розчину ейконогену. Дистильованою водою суміш доводили до мітки 25 см^3 і ставили у водяну баню. Через 5 хв проби охолоджували у воді до $18\ldots 20\text{ }^\circ\text{C}$ і колориметрували. Виражену мілігрампроцентами концентрацію фосфору визначали за формулою (2.5.)

(ф.2.5.),

де h_1 – покази приладу для стандартного розчину,

h – покази приладу для дослідної проби,

16 – постійний коефіцієнт.

Визначення концентрації загального фосфору. До $0,05\text{ см}^3$ свіжоотриманої нерозрідженої або $0,5\text{ см}^3$ розрідженої в 10 раз сперми у колбу К'ельдаля доливали 2 см^3 5 н H_2SO_4 . На дно колби кидали скляні намистинки. Колбу закривали, а реакційну суміш повільно випаровували. Мінералізований залишок 5 хв витримували на сильному вогні, злегка охолоджували і додавали

2 каплі перекису водню. Нагрівали до повного знебарвлення і знову охолоджували. Осад переносили у мірну колбу на 25 см^3 і додавали: $0,5\text{ см}^3$ $0,1\text{ н}$ перманганату калію, 2 см^3 розчину молібденовокислого амонію та 2 см^3 ейконогену. Отриманий розчин доводили дистильованою водою до мітки 25 см^3 . Одночасно в іншу мірну колбу наливали 2 см^3 стандартного розчину калію фосфорнокислого однозаміщеного і здійснювали аналогічну процедуру.

Колби з розчинами витримували 5 хв у водяній бані за $37\text{ }^\circ\text{C}$, охолоджували і колориметрували. Концентрацію загального фосфору у пробах визначали мілігрампроцентами (мг%) за формулою (2.6.)

(ф. 2.6.),

де h_1 - покази приладу для стандартного розчину,

h - покази приладу для дослідної проби,

320 - постійний коефіцієнт.

Визначення концентрації кислоторозчинного фосфору. $0,5\text{ см}^3$ трихлороцтового фільтрату сперми мінералізували, колориметрували і, за описаною вище схемою, визначали концентрацію загального фосфору.

Білок дослідних проб сперми осаджували доливанням до 1 см^3 розчину 4 см^3 дистильованої води і 5 см^3 10% розчину ТХО. Суміш перемішували. Осад білка відокремлювали центрифугуванням або фільтруванням. До 5 см^3 безбілкового центрифугату (фільтрат) додавали $1,5\text{ см}^3$ розчину молібденовокислого амонію і $0,15\text{ см}^3$ розчину відновлювального агенту. Суміш перемішували і $10\ldots 15$ хв витримували за $37\text{ }^\circ\text{C}$. Колориметрували проби за довжини хвилі $620\ldots 700\text{ нм}$ проти контролю в кюветі з шириною шару 10 мм .

Побудова калібрувальної кривої. Із стандартного розчину калію фосфорнокислого однозаміщеного з концентрацією 50 мкг/см^3 готували робочі розчини, як вказано в табл. 2.13. Після 10...15 – хвилинного витримування за температури 37°C проби колириметрували, як дослідні. Результати порівнювали з даними контрольної проби на реактиви.

Таблиця 2.13.

Рівень концентрації фосфору у пробах дослідного ряду

№ пробірки	Стандартний розчин солі (см^3)	Дистильована вода (см^3)	Концентрація фосфору ($\Phi_{\text{н}}, \text{мкг/см}^3$)	Концентрація фосфору ($\Phi_{\text{н}}, \text{мкг/пробу}$)
1	0,2	4,8	10	2
2	0,4	4,6	20	4
3	0,6	4,4	30	6
4	0,8	4,2	40	8
5	1,0	4,0	50	10

Визначення активності транспортних АТФаз (ДСТУ UA, ДР № 010080005644). Активність транспортних АТФаз визначали за інтенсивністю гідролізу АТФ до АДФ (зміни концентрації білка і фосфору дослідної проби, яку внесли у реакційну суміш).

Проведення досліджень. Визначення активності АТФаз здійснювали у реакційних сумішах (№ 1, 2 і 3), які готували завчасно.

Реакційну суміш № 1 використовували для визначення сумарної активності Na^+/K^+ - та Mg^{2+} - АТФаз. У мірну колбу на 100 см^3 вносили 50 см^3 дистильованої води, розчиняли 127 мг (5 мМ) MgCl_2 , 804,4 мг (110 мМ) NaCl , 373 мг (40 мМ) KCl , доливали 20 см^3 20 мМ розчину трис- HCl ($\text{pH} = 7,4$). Об'єм розчину у колбі доводили дистильованою водою до мітки 100 см^3 . Розчином 0,1 М трис- HCl виводили pH реакційної суміші на рівень 7,4.

Реакційну суміш № 2 використовували для визначення активності Mg^{2+} - АТФази. У мірну колбу на 100 см^3 вносили 50 см^3 дистильованої води, розчиняли 127 мг (5 мМ) MgCl_2 , 699,4 мг (150 мМ) KCl , 38 мг (1 мМ) EGTA, доливали 20 см^3 20 мМ розчину трис- HCl ($\text{pH} = 7,4$). Об'єм розчину у колбі

доводили дистильованою водою до мітки 100 см³. Розчином 0,1 М трис-НСl виводили рН реакційної суміші на рівень 7,4.

Реакційну суміш № 3 використовували для визначення сумарної активності Ca²⁺/Mg²⁺ - та Mg²⁺ - АТФаз. У мірну колбу на 100 см³ вносили 50 см³ дистильованої води, розчиняли 127 мг (5 мМ) MgCl₂, 699,4 мг (150 мМ) KCl, 5 мкМ CaCl₂, доливали 20 см³ 20 мМ розчину трис-НСl (рН = 7,4). Об'єм розчину у колбі доводили дистильованою водою до мітки 100 см³. Розчином 0,1 М трис-НСl виводили рН реакційної суміші на рівень 7,4.

Для відокремлення спермальної плазми від сперматозоїдів 2 см³ сперми впродовж 5 хв центрифугували за 800 g. Супернатант (спермальна плазма) зливали, а осад ресуспензували у 2 см³ середовища для відмивання сперматозоїдів (702,0 мг NaCl розчиняли у 0,02 М буфері трис-НСl, додавали 20 см³ 0,1 М трис-НСl і дистильованою водою доводили об'єм середовища до мітки 100 см³), яке охолоджували до 3...5 °С. Кінцевий рівень рН вказаного середовища становив 7,4.

Операцію з відмивання сперматозоїдів здійснювали 3 рази. До осаду відмитих сперматозоїдів додавали 2 см³ середовища. Отриману суспензію активно перемішували гомогенізатором. Для пермеабілізації мембран сперматозоїдів до 2 см³ суспензії відмитих клітин додавали 0,2 см³ охолодженого льодом 0,2 % розчин сапоніну. Суспензію ретельно перемішували і через 5...10 хв визначали концентрацію білка у дослідній пробі.

Аналіз результатів. Визначення концентрації білка у дослідних пробах здійснювали за методикою Лоурі, а визначення концентрації фосфору – за Фіске-Суббароу. Знайдені величини концентрації білка і фосфору у дослідній пробі використали для визначення активності транспортних АТФаз за формулою (2.7.)

$$A = \frac{C_{\Phi}}{0,2 \cdot 30 \cdot C_6}$$

(ф. 2.7.)

де А – активність фермента (мкг Φ_n /мг білка · хв),

C_{Φ} - концентрація неорганічного фосфору (мкг),

0,2 - коефіцієнт перерахунку на мг білка,

30 - час гідролізу проби (хв),

C_6 - концентрація білка (мг).

Показник активності Na^+/K^+ - та Mg^{2+} -АТФаз приймали за A_1 ; Mg^{2+} -АТФази – за A_2 і Ca^{2+}/Mg^{2+} - та Mg^{2+} -АТФаз – за A_3 . Для того, щоб знайти активність Na^+/K^+ -АТФази від показника A_1 віднімали A_2 . Активність Ca^{2+}/Mg^{2+} -АТФази шукали за різницею $A_3 - A_2$; активності Mg^{2+} -АТФази за показником A_2 .

2.2.12. Визначення концентрації жирних кислот

Для визначення концентрації насичених і ненасичених етерифікованих та неетерифікованих ЖК від дослідних проб відбирали 1 см³ сперми. Стан структури білків сперми та акросоми й цитоплазматичної мембрани сперматозоїдів 20...30 хв фіксували 2 % розчином глутаральдегіду. Після періоду фіксації проб сперми її, методом центрифугування за 800g впродовж 5 хв, розділяли на спермальну плазму і відцентрифуговану масу клітин. У розділених складових, методом газової хроматографії (“Chrom – 5”), визначали концентрацію ЖК [193, 251].

2.2.13. Визначення концентрації про- і протизапальних інтерлейкінів у спермальній плазмі

Для визначення концентрації інтерлейкінів ІЛ-6, 8, 10 розріджену сперму 20 хв за 600g центрифугували. Відібраний об'єм спермальної плазми зберігали у холодильній камері за -20°C . Під час проведення аналітичних досліджень заморожені зразки сперми швидко розморожували і старанно перемішували до однорідної консистенції.

У зразках спермальної плазми, згідно вимог інструкції до набору реактивів фірми “Вектор-Бест”, визначали концентрацію інтерлейкінів: ІЛ-6 (набір реагентів А-8768), ІЛ-8 (набір реагентів А-8762), ІЛ-10 (набір реагентів А-8774). Метод визначення базується на трьохстадійному “сендвіч” варіанті твердофазного імуноферментного аналізу з використанням моно- і поліклональних антитіл до ІЛ-6, 8, 10. На першій стадії аналізу досліджувані й контрольні зразки інкубували в лунках з іммобілізованими антитілами. Наявні у спермальній плазмі інтерлейкіни (ІЛ-6, 8, 10) зв'язувалися з антитілами. За час інкубації вони взаємодіяли з кон'югатом № 1 (антитіла - інтерлейкін з біотином). На третій стадії, зв'язаний кон'югат № 1 взаємодіяв з кон'югатом № 2 (стрептовідин з пероксидазою хрому).

Кількість зв'язаного кон'югату № 2 визначали імуноферментним аналізатором (Stat-fax 303). Отримана інтенсивність жовтого кольору – пропорційна визначеній концентрації інтерлейкінів у дослідних зразках.

2.2.14. Методика статистичного аналізу результатів досліджень

Отримані результати аналізували методом варіаційної статистики [7, 236, 304] з використанням пакету програм Microsoft Excel version 14.10 (110310). Розраховували середнє арифметичне (M), стандартну похибку ($\pm m$), середнє квадратичне відхилення (σ), коефіцієнт варіації (C_v). Для дослідних груп виконаних досліджень, за критерієм Ст'юдента (t), знаходили вірогідність різниці (P). До вірогідно різних результатів відносили $P \leq 0,05$. Для окремих показників вираховували критерій детермінованості (r), який у випадку лінійної

регресії є квадратом коефіцієнту кореляції і відображає прямий лінійний зв'язок між варіантами дослідних груп.

Публікації до розділу 2

1. Оцінка впливу умов кріоконсервації на гомеостаз Ca^{2+} , K^{+} , Na^{+} у сперматозоїдах і спермальній плазмі / Г. В. Максим'юк, Д. З. Воробець, В. М. Максим'юк, Г. В. Зверева, Б. М. Чухрій, Й. З. Сірацький // Клінічна та експериментальна патологія. – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 116 – 120.
2. Методика оцінки поліморфізму сперматозоїдів та їх деструкції в умовах кріоконсервації / Г. В. Максим'юк, Д. З. Воробець, В. М. Максим'юк, Г. В. Зверева, Б. М. Чухрій, Й. З. Сірацький // Вісник проблем біології і медицини. – 2005. – Вип.3. – С. 88 – 93.
3. Технологія одержання сперми і способи оцінки життєздатності сперматозоїдів / В. П. Буркат [та ін.]. – Оброшино : [Б.в.], 2006. – 42 с.
4. Максим'юк Г. В. Модифікована і стандартизована методика визначення активності транспортних АТФ-аз за концентраціями білка і фосфору в спермі / Г. В. Максим'юк // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького. – 2010. – Ч. 1. – Т. 12, № 2 (44). – С. 194 – 202.
5. Максим'юк Г. В. Модифікована і стандартизована методика визначення активності транспортних АТФаз за концентраціями білка і фосфору в спермі / Г. В. Максим'юк // Міжнародна науково-практична конференція "Стан, проблеми та перспективи розвитку сучасної аграрної науки і практики" : матеріали. конф. м. Львів, 17–18 черв. 2010 р. – Львів, 2010. – С. 42.
6. Максим'юк Г. В. Стандартизована методика визначення ступеня поліморфізму і деструкції сперматозоїдів у нативній і кріоконсервованій спермі / Г. В. Максим'юк, Д. З. Воробець // Вісник проблем біології і медицини. – 2011. – Вип.4. – С. 186 – 190.

7. Максимюк Г. В. Стандартизована методика визначення концентрації і переміщеної кількості Ca^{2+} , K^{+} , Na^{+} у системі "клітина - середовище" / Г. В. Максимюк, В. М. Максим'юк // Фізика живого. – 2011. – Т.19, №1. – С. 10 – 15.

8. Максимюк Г. В. Методика визначення концентрації вільних і зв'язаних іонів Ca^{2+} , K^{+} , Na^{+} у фракціях водних екстрактів проб біологічного матеріалу / Г. В. Максимюк, Л. Є. Лаповець // Лабораторна діагностика. – 2012. – №1. – С. 9 – 11.

9. Пат. № 69773 U Україна, МПК G 01N21/00 Спосіб визначення концентрації вільних та зв'язаних іонів у водних екстрактах проб біологічного матеріалу / Г. В. Максимюк, З. Д. Воробець, Л. Є. Лаповець, Д. І. Санагурський, В. М. Максим'юк; заявник, патентовласник: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького. – № u 201113162 ; заявл. 08.11.2011 ; опубл. 10.05.2012, Бюл. № 9. – 4 с.

10. Оцінювання повноцінності стану структури й функцій сперматозоїдів нативної та кріоконсервованої сперми / Г. М. Седіло, В. М. Максим'юк, Г. В. Максимюк [та ін.]. – Львів-Оброшино, 2014 – 44 с.

11. Сперма, сперматозоїди, відтворювальна здатність / Г. М. Седіло, М. І. Башенко, Г. В. Максимюк [та ін.]. – Львів, 2015 – 134 с.

РОЗДІЛ 3

ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Особливості гомеостазу Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у тканинах статевих органів

Відомо, що повноцінність структури й функцій сперматозоїдів закритих (тканини статевих органів) та відкритих (сперма) систем типу “середовище - клітина” пов’язана з параметрами концентрації іонів лужних металів (Ca^{2+} , K^+ , Na^+), концентрації й активності молекул таких органічних сполук як АТФази, ЖК, інтерлейкіни тощо. Створений іонами неорганічних та молекулами органічних біологічно активних речовин градієнт їх концентрацій регулює інтенсивність перебігу “реакції - відповіді” клітин на дію екзо- та ендогенних чинників, ініціює перетворення одного виду акумульованої енергії в інший, забезпечує постачання поживних речовин у клітини та органи [59, 74, 155, 387, 409]. Однак природу і суть цих процесів не можна зрозуміти без з’ясування особливостей гомеостазу іонів у тканинах статевих органів, за яких відбувається формування первинного (початкового) стану структури й функцій еякульованих сперматозоїдів.

З цього приводу відомо, що рівноважний стан вмісту іонів епітеліальної тканини шкіри і оболонки калитки, препуція і м’язової тканини підіймача яєчка пов’язаний з захисною (терморегуляторна); епітеліальної (еластична), опорнотрофічної (м’язовоеластична), м’язової тканин сім’яного канатика і білкової оболонки яєчок – з трофічною; паренхіми яєчок – з генеративною сперматозоїдогенною; придатка, міхурцевої, передміхурової (простата) і бульбоуретральних (Куперових) залоз – з генеративною плазмогенною; опорнотрофічної (еластична) ампули сім’япроводу й опорнотрофічної (щільна, рихла) прутня – з транспортною функціями органів статевої системи самців [28, 50, 175, 231, 530].

Відомо також, що реакція самки на самця виражена відповідною послідовністю функцій її статевих органів. Комплексна сумарна дія

біохімічного складу сперми після введення сперми у піхву та підвищена концентрація гормонів (окситоцин, простагландини) у крові самки – посилюють ритміку скорочень гладких м'язів і миготливого епітелію геніталій. Їх слизова оболонка змінює колір і консистенцію. Виділений слиз стає рідким, що забезпечує інтенсивне переміщення сперматозоїдів до місця їх ефективного контакту з яйцеклітиною [105...107].

Отже, особливості взаємозв'язку наведених ознак репродуктивного процесу свідчать: – функції тканин статевих органів самців і самок тісно пов'язані з параметрами гомеостазу Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у системі “середовище - клітина”. Тому, як моделі для вивчення особливостей впливу ендо- та екзогенних чинників на повноцінність стану структури й функцій сперматозоїдів використали проби сперми плідних і неплідних чоловіків, проби сперми бугаїв високої якості та фракції водних екстрактів тканин репродуктивних органів бугаїв і корів. Дослідження особливостей змін структури й функцій сперматозоїдів проводили за наведеною схемою (рис. 2.1.).

Метою даного етапу досліджень є вивчення особливостей гомеостазу Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у тканинах органів статевих систем самців і самок, параметри якого, у той чи інший спосіб, формують повноцінність структури й функцій сперматозоїдів нативної сперми, що забезпечує стійкість їх акросоми й цитоплазматичної мембрани до деструктивної дії екстремальних чинників ТКС.

3.1.1. Гомеостаз вільних і зв'язаних іонів

Тканини статевих органів бугая. Модельними системами для проведення досліджень стали ФВЕ тканин статевих органів бугаїв 12...18-місячного віку чорно-рябої голштинської породи (Рис. 3.1., n = 5).

Досліджували зразки паренхімних, епітеліальних, м'язових, опорно-трофічних тканин, а саме: шкіри калитки (*Cutis scrotum*), м'язовоеластичної (*Tunica dartos*), спеціальної піхвової (*Tunica vaginalis propria*) оболонок,

підіймача яєчка (*M. cremaster externus*), сім'яного канатика (*Funiculus spermaticus*), білкової оболонки (*Tunica albuginea*), яєчка (*Testis*), головки

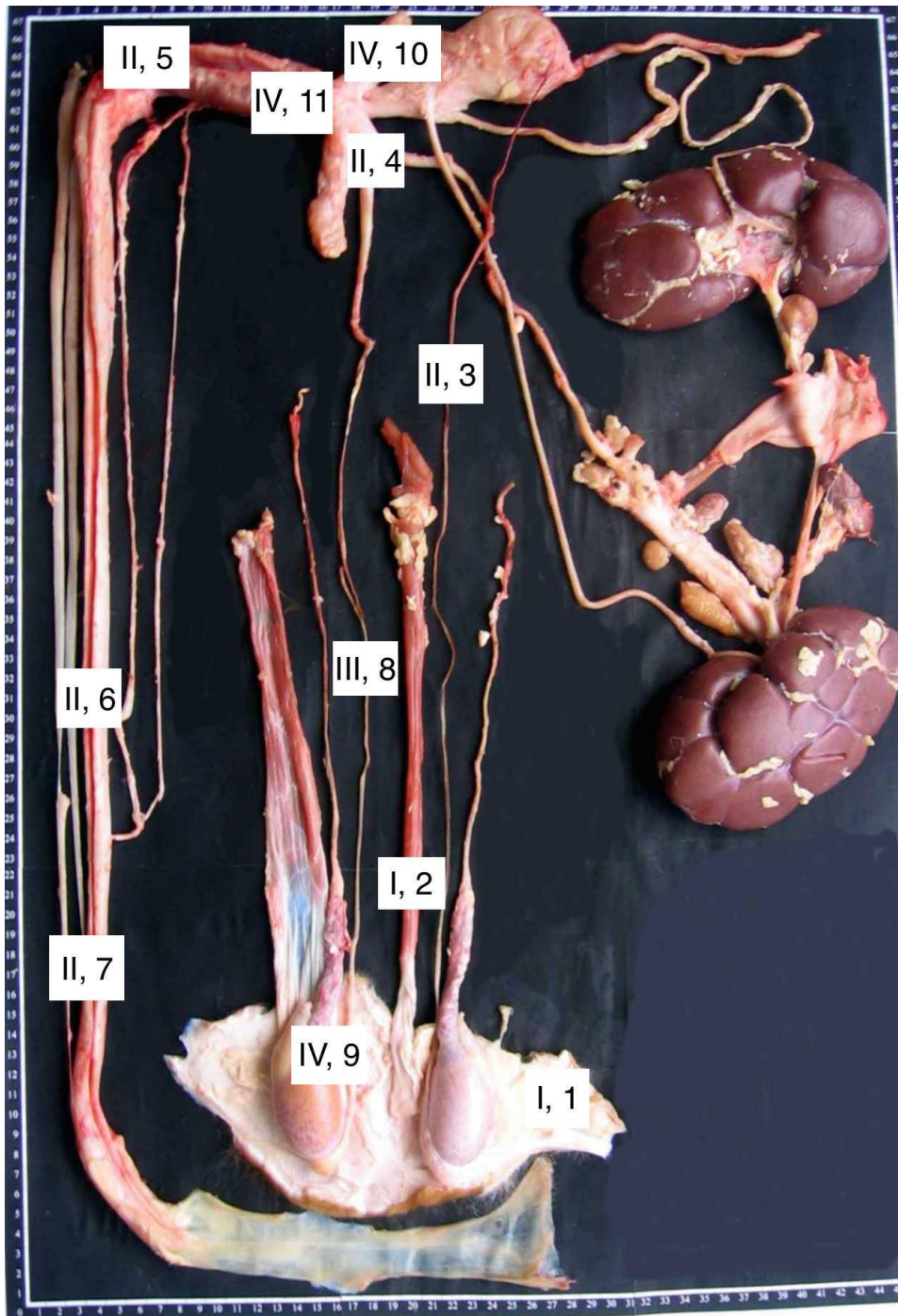


Рис. 3.1. Статеві органи бугая.

Примітка. I. Органи, які виконують захисну (шкіра калитки – 1, м'язевоеластична та спеціальна піхвова оболонка, підіймач яєчка – 2). II – транспортну (сім'япроводи – 3, ампула сім'япроводу – 4, корінь – 5, тіло – 6 і головка прутня – 7). III – трофічну (сім'яний канатик – 8). IV – генеративну і секреторну (яєчко, головка, тіло і хвіст придатка – 9, сім'яні міхурці – 10 і Куперові залози – 11)

(Epididymis caput) і хвоста (Epididymis cauda) придатка яєчка (Epididymis testis), спермовиносного (екскреторного) каналу (протоки) або сім'япроводу (Ductus deferens), ампули сім'япроводу (Ampula ductus), міхурцевої (Gl. vesiculosa), передміхурової (Gl. prostata) залоз, м'язів (M. bulbocavernosus, M. bulbospongiosus, M. ischiocavernosus), кореня (Radix penis), тіла (Corpus penis), головки (Glans penis) і препуція (Praeputium) прутня (Penis).

Відношення гомеостазу іонів лужних металів до функцій органів статеві системи самців наводимо на прикладі тканин органів, які виконують захисну (шкіра калитки, м'язовоеластична та спеціальна піхвова оболонки, підіймач яєчка, препуцій, $n = 25$), трофічну (сім'яний канатик, білкова оболонка, $n = 10$), генеративну (яєчко, головка і хвіст придатка, міхурцева і передміхурова залози, $n = 25$) та транспортну (сім'япровід і ампула сім'япроводу, м'язи, корінь, тіло і головка прутня, $n = 30$) функції (табл. 3.1...3.3).

Таблиця 3.1

Абсолютні показники концентрації Ca^{2+} (мМ)

Функції	Стат. показ-ники	ФВЕ, № 1...4				
		C_1	C_2	C_3	C_4	$\Sigma C_{1...4}$
Захисна ($n = 25$)	$M \pm m$	$5,3 \pm 1,4$	$1,7 \pm 0,4$	$0,5 \pm 0,1^*$	$0,6 \pm 0,2$	$8,2 \pm 1,5$
	C_v	58	57	24	65	52
	lim	3...11	1...3	0,4...0,7	0,3...1,4	6...14
Трофічна ($n = 10$)	$M \pm m$	$3,6 \pm 0,9$	$1,6 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,02^*$	$0,6 \pm 0,2$	$6,2 \pm 1,3$
	C_v	39	8	7	53	29
	lim	3...5	1...2	0,3...0,4	0,4...0,9	5...8
Генера-тивна ($n = 25$)	$M \pm m$	$5,2 \pm 0,6$	$1,7 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,1^*$	$0,4 \pm 0,1$	$7,8 \pm 0,8$
	C_v	28	37	27	53	21
	lim	3...7	1...3	0,3...0,7	0,2...0,8	5...9
Транс-портна ($n = 30$)	$M \pm m$	$5,2 \pm 0,8$	$1,6 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,03$	$0,5 \pm 0,1$	$7,7 \pm 0,7$
	C_v	38	41	19	44	23
	lim	3...9	1...3	0,3...0,5	0,3...0,9	7...11

Примітка. У ФВЕ №3 тканин органів, які виконують захисну і трофічну, трофічну і генеративну функції, вірогідність різниці між показниками концентрації $\text{Ca}^{2+} - > 0,05^*$.

Наведені у таблиці 3.1 показники статистики й розподілу абсолютної концентрації Ca^{2+} свідчать: визначені її мінімальні ($6,2 \pm 1,3$ мМ) значення з показників суми ($\sum C_{1...4}$) властиві ФВЕ тканин, гомеостаз вільних і зв'язаних іонів яких забезпечує діяльність трофічної функції; максимальні ($8,2 \pm 1,5$ мМ) – захисної.

Виявили, що концентрація Ca^{2+} ФВЕ поступово знижується, а саме: $C_1 > C_2 > C_3$, але $C_3 \geq C_4$. У вказаному ряду найвищою є концентрація вільних іонів ($3,6...5,3$ мМ). Ліміти концентрації слабо зв'язаних іонів з легкорозчинними неорганічними і органічними сполуками ($1,6...1,7$ мМ) в 2...3 разу менші ніж вільних; міцно зв'язаних з важкорозчинними ($0,4...0,5$ мМ) – в 3...4 разу менші, ніж зв'язаних з легкорозчинними. Проте ліміти концентрацій міцно зв'язаного Ca^{2+} з важкорозчинними сполуками ($0,4...0,5$ мМ), майже співпадають з нерозчинними Ca^{2+} ($0,4...0,6$ мМ).

Таблиця 3.2

Абсолютні показники концентрації K^+ (мМ)

Функції	Стат. показники	ФВЕ, № 1...4				
		C_1	C_2	C_3	C_4	$\sum C_{1...4}$
Захисна (n =25)	$M \pm m$	$28,8 \pm 6,5^*$	$16,0 \pm 3,5$	$8,8 \pm 1,4^*$	$10,6 \pm 2,7$	$64,2 \pm 8,7^*$
	Cv	51	48	36	57	31
	lim	19...54	9...29	4...13	3...18	46...96
Трофічна (n=10)	$M \pm m$	$37,4 \pm 14,5$	$17,4 \pm 4,4$	$10,9 \pm 1,04$	$5,0 \pm 2,4^*$	$70,7 \pm 17,6$
	Cv	55	36	14	68	35
	lim	23...52	13...22	10...12	3...7	53...88
Генера- тивна (n =25)	$M \pm m$	$65,6 \pm 14,9^*$	$25,9 \pm 5,3$	$14,0 \pm 2,5^*$	$6,0 \pm 1,9$	$111,5 \pm 20,2^*$
	Cv	51	46	40	73	40
	lim	38...113	11...39	9...24	1...11	72...181
Транс- портна (n =30)	$M \pm m$	$48,7 \pm 12,0$	$21,3 \pm 3,1$	$9,2 \pm 1,1^*$	$12,4 \pm 3,6^*$	$91,6 \pm 14,0$
	Cv	60	36	29	71	37
	lim	19...88	15...36	6...13	3...22	49...142

Примітки. 1. У ФВЕ №1 тканин органів, які виконують захисну і генеративну функції, вірогідність різниці між показниками концентрації K^+ становить $>0,05...<0,05^*$. 2. У ФВЕ №3 K^+ (генеративна:транспортна) – $>0,05^*$. 3. У ФВЕ №4 (трофічна:транспортна) – $>0,05...<0,05^*$; 4. $\sum C_{1...4}$ (трофічна:транспортна) – $<0,05^*$.

Різниця між показниками мінімальної й максимальної концентрації Ca^{2+} у ФВЕ № 1 становить 1,74, № 2 – 0,13, № 3 – 0,11, № 4 – 1,24 мМ, що відповідно складає 36, 8, 24, 44 % її середніх значень. Наведені результати наводять на думку, що визначена різниця між показниками абсолютної та відносної концентрації Ca^{2+} є важливою складовою системи, яка створює відповідні умови (буферний або компенсаторний бар'єр) для ефективної саморегуляції захисної, трофічної, генеративної і транспортної функцій органів статеві системи самців (бугай).

Таблиця 3.3.

Абсолютні показники концентрації Na^+ (мМ)

Функції	Стат. показники	ФВЕ, № 1...4				
		C_1	C_2	C_3	C_4	$\sum C_{1...4}$
Захисна (n =25)	$M \pm m$	103,8 $\pm$ 11,4**	50,7 $\pm$ 9,8	25,0 $\pm$ 2,5*	18,8 $\pm$ 5,1*	198,2 $\pm$ 20,2**
	Cv	25	43	22	61	23
	lim	79...141	30...84	19...34	6...34	171...253
Трофічна (n=10)	$M \pm m$	58,0 $\pm$ 6,2**	35,0 $\pm$ 10,4*	19,3 $\pm$ 1,6*	14,7 $\pm$ 2,2*	127,0 $\pm$ 15,9**
	Cv	15	42	12	21	18
	lim	52...64	25...45	18...21	12...17	111...143
Генера- тивна (n =25)	$M \pm m$	143,6 $\pm$ 14,9***	55,3 $\pm$ 7,0*	22,5 $\pm$ 3,6	9,2 $\pm$ 2,1*	230,6 $\pm$ 15,9***
	Cv	23	28	36	50	35
	lim	91...179	33...74	15...36	3...14	190...282
Транс- портна (n =30)	$M \pm m$	100,6 $\pm$ 11,4*	50,2 $\pm$ 6,8	25,6 $\pm$ 3,8	26,7 $\pm$ 9,9*	203,2 $\pm$ 25,1**
	Cv	28	33	36	91	29
	lim	68...149	35...74	12...36	1...70	160...329

Примітки. 1. У ФВЕ №1 тканин органів, які виконують захисну і генеративну, генеративну і транспортну функції, вірогідність різниці між показниками концентрації Na^+ становлять $<0,05^*$. 2. У ФВЕ №2 (трофічна:генеративна) – $>0,05^*$. 3. У ФВЕ №3 (захисна:трофічна) – $>0,05^*$. 4. У ФВЕ №4 (захисна:генеративна, трофічна:генеративна, генеративна:транспортна) – $>0,05...<0,05^*$. 5. $\sum C_{1...4}$ (захисна:трофічна, трофічна:транспортна) – $<0,02^{**}$, трофічна:генеративна) – $<0,001^{***}$.

З цього приводу слід зауважити таке. Широка межа коефіцієнту варіації ($Cv_{\min...max} = 7...65\%$) $\sum C_{1...4} \text{Ca}^{2+}$ ФВЕ призводить до того, що лише щодо концентрації Ca^{2+} тканин, які виконують захисну і трофічну функції (ФВЕ № 3),

можна говорити про виявлену тенденцію до вірогідних змін ($P > 0,05$). В усіх інших варіантах вірогідність її різниці більша за $0,1 \dots 0,5$.

Мінімальний ($64,2 \pm 8,7$ мМ) показник $\sum C_{1...4} K^+$ виявили у ФВЕ (№ 1...4) тканин, виділені секрети яких регулюють діяльність захисної; максимальний ($111,5 \pm 20,2$ мМ) – генеративної функцій. Однак при поступовому зниженні концентрації Ca^{2+} в ряду $C_1 > C_2 > C_3 > C_4$ вказаний показник у ФВЕ № 4 тканин, які здійснюють захисну і транспортну функції, лише в 1,2...1,3 разу вищий, ніж у ФВЕ № 3. Тоді як різниця між мінімальною і максимальною концентрацією K^+ у ФВЕ № 1 становить 37, № 2 – 10, № 3 – 5, № 4 – 7 мМ, що складає 82, 49, 48, 87 % її середніх значень.

Середній показник максимальної ($65,6 \pm 14,9$ мМ) концентрації вільного K^+ властивий ФВЕ тканин яєчка, головки, хвоста придатка, міхурцевої і передміхурової залоз; мінімальної ($28,8 \pm 6,5$ мМ) – ФВЕ тканин шкіри калитки, м'язовоеластичної і спеціальної піхвової оболонок, підіймача яєчка і препуція (табл. 3.4...3.6).

Таблиця 3.4

Відносні показники концентрації Ca^{2+} (мМ)

Функції	Стат. показники	ФВЕ, № 1...4				
		C_1	C_2	C_3	C_4	$\sum C_{1...4}$
Захисна (n = 25)	$M \pm m$	$65,0 \pm 4,8$	$21,0 \pm 5,4$	$6,1 \pm 1,1$	$7,9 \pm 1,4$	100
	Cv	17	54	37	39	
	lim	54...78	9...35	3...9	4...11	
Трофічна (n = 10)	$M \pm m$	$56,7 \pm 4,0$	$26,9 \pm 4,1$	$6,8 \pm 1,7$	$9,6 \pm 1,8$	100
	Cv	10	22	36	26	
	lim	53...61	23...31	5...8	8...11	
Генеративна (n = 25)	$M \pm m$	$65,6 \pm 3,6$	$21,85 \pm 2,43$	$7,0 \pm 1,5$	$5,5 \pm 1,5$	100
	Cv	12	25	49	61	
	lim	57...78	16...28	4...13	2...11	
Транспортна (n = 30)	$M \pm m$	$66,2 \pm 5,8^*$	$21,7 \pm 4,2$	$5,4 \pm 0,6$	$6,6 \pm 1,2$	100
	Cv	21	48	26	44	
	lim	39...77	13...41	4...8	4...12	

Примітки. 1. У ФВЕ №1 тканин органів, які виконують трофічну і транспортну функції, вірогідність різниці між показниками концентрації Ca^{2+} – $> 0,05^*$.

Однак, якщо мінімальна й максимальна концентрація слабо зв'язаного K^+ з легкорозчинними неорганічними і органічними сполуками (16,0...25,9 мМ) в 2...3 разу менша, ніж вільного, то міцно зв'язаного з важкорозчинними (8,8...14,0 мМ) в 2 рази менша, ніж легкорозчинного.

За наявності широкої межі лімітів коефіцієнту варіації ($C_{v_{min...max}} = 13...73\%$) показника $\sum C_{1...4} K^+$ та показника концентрації вільних іонів тканин шкіри калитки, м'язовоеластичної і спеціальної піхвової оболонок, підіймача яєчка, препуція (захисна функція) та яєчка, головки і хвоста придатка, міхурцевої і передміхурової залоз (генеративна функція) виявили тенденцію до її вірогідної різниці ($P > 0,05... < 0,05$). Наведена межа вірогідності даних експерименту характерна також для концентрації K^+ у ФВЕ № 3 тканин, гомеостаз яких регулює діяльність генеративної і транспортної, а ФВЕ № 4 – трофічної і транспортної функцій.

Таблиця 3.5

Відносні показники концентрації K^+ (мМ)

Функції	Стат. показ-ники	ФВЕ, № 1...4				
		C_1	C_2	C_3	C_4	$\sum C_{1...4}$
Захисна (n = 25)	$M \pm m$	43,2 $\pm$ 3,5	24,1 $\pm$ 2,2	14,0 $\pm$ 2,2	18,6 $\pm$ 5,3*	100
	C_v	18	21	34	64	
	lim	36...57	17...30	8...20	3...35	
Трофічна (n=10)	$M \pm m$	51,0 $\pm$ 7,9	24,6 $\pm$ 0,1	16,0 $\pm$ 2,5*	8,41 $\pm$ 5,50	100
	C_v	22	1	22	92	
	lim	43...59	24...25	13...19	3...14	
Генера-тивна (n = 25)	$M \pm m$	57,0 $\pm$ 3,2	22,9 $\pm$ 2,8	13,20 $\pm$ 1,76>	6,9 $\pm$ 2,99*	100
	C_v	13	28	30	94	
	lim	51...67	15...32	7...17	1...15	
Транс-портна (n = 30)	$M \pm m$	49,5 $\pm$ 6,1	24,4 $\pm$ 2,7	10,8 $\pm$ 1,4*	15,3 $\pm$ 4,8	100
	C_v	30	27	32	77	
	lim	31...40	15...35	6...16	3...31	

Примітки. 1. У ФВЕ №3 тканин органів, які виконують трофічну і транспортну функції, вірогідність різниці між показниками концентрації K^+ – $> 0,05^*$. 2. У ФВЕ №4 K^+ (захисна:генеративна) – $> 0,05^*$.

Визначені мінімальні середні показники $\sum C_{1...4} Na^+$ ($127,0 \pm 15,9$ мМ) властиві тканинам, гомеостаз іонів яких регулює діяльність трофічної; максимальні ($230,6 \pm 15,9$ мМ) – генеративної функцій. Але параметри концентрації вільного і зв'язаного Ca^{2+} і K^+ поступово від ФВЕ № 1 до № 4 стають меншими ($C_1 > C_2 > C_3 > C_4$).

Таблиця 3.6

Відносні показники концентрації Na^+ (мМ)

Функції	Стат. показ-ники	ФВЕ, № 1...4				
		C_1	C_2	C_3	C_4	$\sum C_{1...4}$
Захисна (n =25)	$M \pm m$	$52,3 \pm 1,2^{***}$	$24,8 \pm 2,5$	$12,8 \pm 0,9^*$	$10,1 \pm 2,7^*$	100
	Cv	5	23	16	60	
	lim	50...56	19...33	9...15	1...18	
Трофічна (n=10)	$M \pm m$	$45,8 \pm 0,9^{**}$	$27,0 \pm 4,8$	$15,3 \pm 0,7^{**}$	$12,0 \pm 3,3^*$	100
	Cv	3	25	6	38	
	lim	45...47	22...32	15...16	9...15	
Генера-тивна (n =25)	$M \pm m$	$62,0 \pm 4,6^*$	$24,4 \pm 3,8$	$9,7 \pm 1,4^{**}$	$3,9 \pm 0,7^*$	100
	Cv	17	35	31	40	
	lim	48...75	16...39	7...15	1...5	
Транс-портна (n =30)	$M \pm m$	$49,9 \pm 2,3^*$	$25,2 \pm 2,8$	$12,9 \pm 1,8$	$12,0 \pm 3,3^*$	100
	Cv	11	27	34	67	
	lim	43...59	18...34	6...19	1...21	

Примітки. 1. У ФВЕ №1 тканин органів, які виконують захисну і трофічну функції, вірогідність різниці між показниками концентрації Na^+ становить $<0,001^{***}$, (трофічна:генеративна) – $<0,01^{**}$, (захисна:генеративна, генеративна:транспортна) – $>0,05...<0,05^*$. 2. У ФВЕ №3 (захисна:транспортна, захисна:генеративна) – $>0,05...<0,05^*$, (трофічна:генеративна) – $<0,01^{**}$. 3. У ФВЕ №4 (захисна:генеративна, трофічна:генеративна, генеративна:транспортна) – $>0,05...<0,05^*$.

Вказана особливість властива також для концентрації Na^+ . Проте, якщо мінімальну середню концентрацію вільного Na^+ ($58,0 \pm 6,2$ мМ) визначили у фракціях тканин шкіри калитки, м'язовоеластичної і спеціальної піхвової оболонки, підіймача яєчка і препуція (захисна функція), то максимальну ($143,6 \pm 14,9$ мМ) – у ФВЕ тканин яєчка, головки і хвоста придатка, міхурцевої і передміхурцевої залоз (генеративна функція). При цьому ліміти концентрації легкодисоційованих іонів ($35,0...55,3$ мМ) в 2...3 рази менші, ніж вільних;

важкодисоційованих (19,3...25,6 мМ) – в 2...2,5 разу менші, ніж легкодисоційованих, а недисоційованих (9,3...26,7 мМ) в 1...2 рази менші, ніж важкодисоційованих.

Широку межу різниці між мінімальними та максимальними показниками концентрації Na^+ , яка пов'язана з діяльністю захисної, трофічної, генеративної і транспортної функцій, виявили у ФВЕ № 1...4. Суттєва розбіжність лімітів абсолютної (6...86 мМ) та відносної (28...101 %) концентрації Na^+ вказує на те, що вузьку (27...42 %) межу змін концентрації слабо і міцно зв'язаних іонів ФВЕ № 2 і 3 регулює високий рівень змін відносної концентрації недисоційованого (101 %) і вільного (84 %) Na^+ у тканинах.

Статистичний аналіз одержаних показників відношень концентрації іонів різнойменних пар $\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$, $\text{K}^+:\text{Ca}^{2+}$ і $\text{Na}^+:\text{K}^+$ ФВЕ тканин, які створюють оптимальні умови для формування структури, життєздатності й запліднювальної здатності сперматозоїдів, свідчить, що норму захисної, трофічної, генеративної і транспортної функцій органів репродуктивної системи бугаїв регулюють різні параметри гомеостазу вільних та зв'язаних іонів (табл. 3.7).

Отже, наведені факти визначених змін свідчать, що відносно вузька межа різниці показників абсолютної й відносної концентрації зв'язаного Ca^{2+} , K^+ , Na^+ (ФВЕ № 2 і 3) виконує саморегульовану, захисну (буферна, компенсаторна) роль, що забезпечує для окремо взятих тканин репродуктивних органів стабільність рівноваги концентрації вільних іонів у системі “середовище - клітина”.

Якщо ліміт середніх відношень концентрації вільного $\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$ становить 18...29:1; легкодисоційованого – 22...36:1; недисоційованого – 25...36:1, то важкодисоційованого – 44...65:1. Слід також зазначити, що для тканин, гомеостаз іонів яких регулює інтенсивність перебігу вказаних функцій, відношення $\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$ ФВЕ № 1 < №2, ФВЕ № 2 < №3, але ФВЕ № 3 > №4.

Співвідношення концентрації важкодисоційованих іонів у тканинах, які виконують захисну і транспортну та трофічну і генеративну функції – в 1...3

разу більші, ніж вільних, легкодисоційованих і недисоційованих форм. Межа коливань коефіцієнту варіації визначених показників – дуже широка ($Cv_{\min...max} = 5...88 \%$). Це призводить до того, що лише щодо вільних і важкодисоційованих форм іонів у тканинах (ФВЕ № 1 і 3), які регулюють генеративну і транспортну функції, можна говорити про вірогідність тенденції до їх зв'язку ($P > 0,05$).

Таблиця 3.7

Співвідношення показників абсолютної концентрації $Na^+ : Ca^{2+}$ (ч. в.)

Функції	Стат. показники	ФВЕ, № 1...4				
		C_1	C_2	C_3	C_4	$\Sigma C_{1...4}$
Захисна (n =25)	M	23:1	35:1	52:1	36:1	26:1
	Cv	38	59	28	88	29
	lim	9...31:1	24...72:1	35...67:1	8...90:1	14...34:1
Тро-фічна (n =10)	M	18:1	22:1	48:1	26:1	22:1
	Cv	52	49	5	34	46
	lim	11...25:1	4...29:1	46...50:1	20...32:1	15...29:1
Генера-тивна (n =25)	M	29:1	36:1	44:1	25:1	31:1
	Cv	26	50	17	52	29
	lim	22...41:1	18...65:1	32...53:1	9...41:1	24...46:1
Транс-портна (n =30)	M	21:1	33:1	65:1	51:1	27:1
	Cv	33	35	41	78	12
	lim	12...31:1	20...49:1	31...92:1	3...103:1	21...31:1

Примітки: 1. * – вірогідність різниці відношень показників абсолютної концентрації $Na^+ : Ca^{2+}$ у ФВЕ №1 і №3 тканин органів, які виконують генеративну і транспортну функції становить $>0,05^*$.

В концентраційному ряду $C_1...C_4$ межа лімітів середніх співвідношень концентрації $K^+ : Ca^{2+}$ поступово зростає від вільних до зв'язаних іонів. Якщо мінімальні й максимальні показники співвідношень концентрації вільних іонів становлять 6...13:1; легкодисоційованих – 11...15:1; недисоційованих – 11...26:1, то важкодисоційованих – 19...28:1 (табл. 3.8).

Але зміну співвідношень $K^+:Ca^{2+}$ у тканинах, гомеостаз іонів яких регулює діяльність захисної і транспортної функцій, виражає концентраційний ряд $C_1 < C_2 < C_3 < C_4$, а трофічної і генеративної – $C_1 < C_2 < C_3 > C_4$.

Співвідношення недисоційованих іонів тканин, які виконують захисну і транспортну функції, в 1...4 рази більші, ніж вільних, легкодисоційованих і важкодисоційованих. Важкодисоційованих форм іонів у тканинах, які виконують трофічну і генеративну функції в 2...3 рази більше, ніж вільних, легкодисоційованих і недисоційованих. Межа коливань коефіцієнту їх варіації – широка ($Cv_{min...max} = 30...103 \%$). Тому можна стверджувати, що саме це є причиною виявленої у ФВЕ тканин органів, які виконують захисну і трофічну та захисну і генеративну функції тенденції до їх зв'язку з параметрами концентрації вільних іонів ($P > 0,05... < 0,05$).

Таблиця 3.8

Співвідношення показників абсолютної концентрації $K^+:Ca^{2+}$ (ч. в.)

Функції	Стат. показники	ФВЕ, № 1...4				
		C_1	C_2	C_3	C_4	$\sum C_{1...4}$
Захисна (n = 25)	M	6:1	11:1	19:1	23:1	8:1
	Cv	52	51	56	91	26
	lim	2...11:1	5...19:1	9...37:1	6...53:1	5...11:1
Трофічна (n = 10)	M	10:1	10:1	27:1	11:1	11:1
	Cv	18	28	20	103	6
	lim	9...11:1	8...13:1	23...31:1	3...19:1	11...12:1
Генеративна (n = 25)	M	13:1	15:1	28:1	16:1	14:1
	Cv	41	42	30	80	30
	lim	6...21:1	8...25:1	18...40:1	4...32±1	9...20:1
Транспортна (n = 30)	M	10:1	15:1	24:1	26:1	12:1
	Cv	59	53	40	69	43
	lim	3...17:1	6...25:1	14...38:1	5...49:1	6...20:1

Примітки: 1. * – вірогідність різниці відношень показників абсолютної концентрації $K^+:Ca^{2+}$ у ФВЕ №1, які виконують захисну і трофічну та захисну і генеративну – $> 0,05... < 0,05^*$, за сумою концентрацій – захисну і трофічну, захисну і генеративну – $< 0,02... < 0,02^{**}$, захисну і транспортну $> 0,05^*$.

На відміну від широких меж співвідношень концентрації вільних і зв'язаних іонів, а саме: $\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$ – 18...65:1, $\text{K}^+:\text{Ca}^{2+}$ – 6...28:1, межа співвідношень $\text{Na}^+:\text{K}^+$ у ряду $\text{C}_1\ldots\text{C}_4$ – дуже вузька (2...4:1). Але, якщо мінімальні й максимальні показники співвідношень концентрації вільних та недисоційованих форм іонів становлять 2...4:1, то легкодисоційованих і важкодисоційованих – 2...3:1 (табл. 3.9). Тому зміну середніх співвідношень концентрації $\text{Na}^+:\text{K}^+$ у тканинах, гомеостаз іонів яких контролює діяльність захисної ($\text{C}_1>\text{C}_2>\text{C}_3<\text{C}_4$), транспортної ($\text{C}_1<\text{C}_2>\text{C}_3<\text{C}_4$), трофічної ($\text{C}_1<\text{C}_2>\text{C}_3<\text{C}_4$) і генеративної ($\text{C}_1<\text{C}_2>\text{C}_3<\text{C}_4$) функцій, виражено різними концентраційними рядами.

Таблиця 3.9

Співвідношення показників абсолютної концентрації $\text{Na}^+:\text{K}^+$ (ч. в.)

Функції	Стат. показники	ФВЕ, № 1...4				
		C_1	C_2	C_3	C_4	$\sum \text{C}_{1...4}$
Захисна (n =25)	M	4:1	3:1	3:1	2:1	3:1
	Cv	20	30	38	46	18
	lim	3...5:1	2...5:1	2...4:1	1...3:1	3...4:1
Трофічна (n =10)	M	2:1	2:1	2:1	4:1	2:1
	Cv	67	72	25	83	51
	lim	1...3:1	1...4:1	1...2:1	2...7:1	1...3:1
Генера- тивна (n =25)	M	3:1	3:1	2:1	2:1	2:1
	Cv	50	65	43	47	43
	lim	1...4:1	1...5:1	1...3:1	1...3:1	1...4:1
Транс- портна (n =30)	M	3:1	3:1	3:1	2:1	3:1
	Cv	74	49	48	53	50
	lim	1...7:1	1...4:1	1...5:1	0,3...3:1	1...5:1

Примітки: 1. * вірогідність різниці відношень показників абсолютної концентрації $\text{Na}^+:\text{K}^+$ у ФВЕ №1, які виконують захисну і трофічну, захисну і генеративну – $>0,05\ldots<0,05^*$; у ФВЕ №3 – захисну і трофічну, захисну і генеративну ($>0,05\ldots<0,05^*$), трофічну і транспортну та генеративну і транспортну ($>0,05^*$).

Співвідношення концентрацій вільного $\text{Na}^+:\text{K}^+$ у тканинах, які виконують захисну і транспортну функції, в 1...2 рази більші, ніж легко-, важко- і недисоційованого. Дещо вищі співвідношення концентрації недисоційованих

форм іонів властиві тканинам, які контролюють трофічну функцію. Їх числові вирази в 2 рази більші, ніж вільних, легко- і важкодисоційованих.

Співвідношення концентрації легкодисоційованих форм іонів у тканинах, які відповідають за стан генеративної функції в 1...2 рази більші, ніж вільних, важкодисоційованих і недисоційованих. Широка межа визначеного коефіцієнту варіації ($Cv_{\min...max} = 20...83 \%$) відношень вільних іонів у ФВЕ тканин, які координують діяльність захисної і трофічної та захисної і генеративної функцій, дозволяє говорити про тенденцію до їх зв'язку ($P > 0,05... < 0,05$).

Порівняльний аналіз особливостей гомеостазу вільних іонів. Для порівняльного аналізу використали ФВЕ тканин статевих органів корів (Рис. 3.2., $n = 9$) віком 2, 6 і 10 років чорно-рябої голштинської породи.

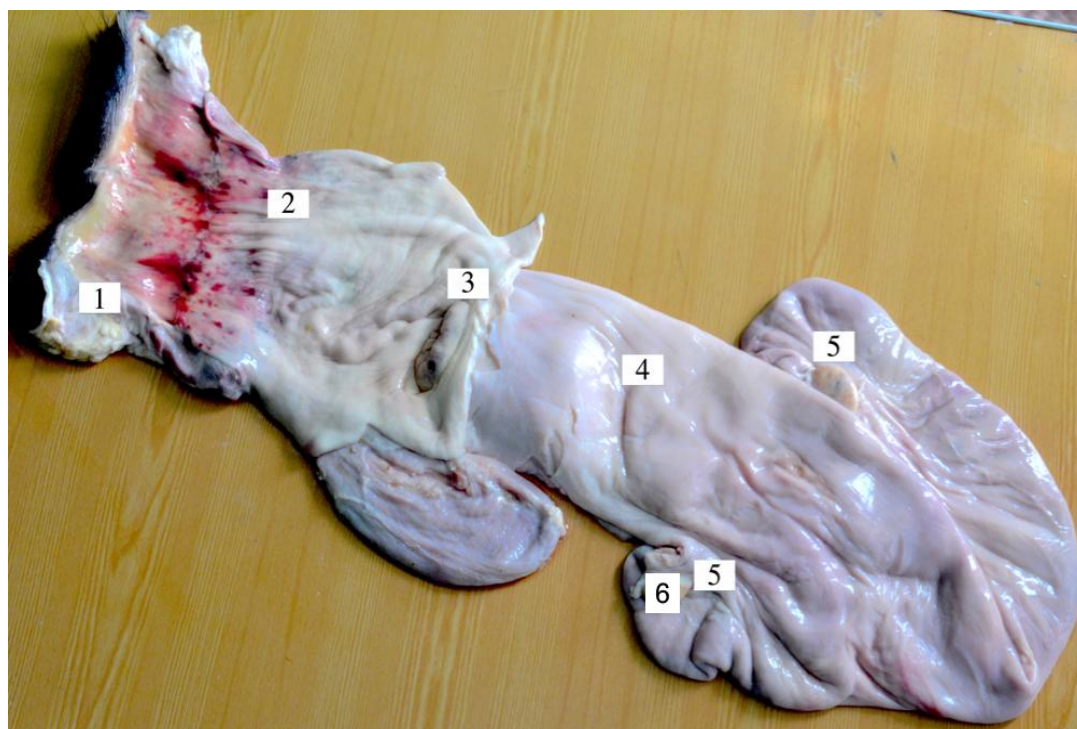


Рис. 3.2. Фотографія. Статеві органи корови: 1 – статеві губи, 2 – піхва, 3 – шийка матки, 4 – тіло матки, 5 – роги матки, 6 – яйники.

Параметри показників ФВЕ тканин статевих губ (Labia pudendi), піхви (Vagina), шийки (Cervix uteri), тіла (Corpus uteri), рогів матки (Cornua uteri),

яйників (Ovarium) наводимо визначеними середніми величинами концентрації вільного K^+ і Na^+ .

Метою аналізу було встановлення особливості різниці концентрації вільного Na^+ і K^+ та її співвідношень у ФВЕ тканин статевих органів бугая (табл. 3.1...3.3) і корови (табл. 3.4, 3.5). Результати досліджень представлені середньоарифметичною величиною (М) концентрації Na^+ і K^+ (мМ), співвідношень концентрації $Na^+:K^+$ (ч.в.) та лімітів їх мінімальних і максимальних значень (lim).

Концентрація Na^+ і K^+ . Порівняльний аналіз параметрів концентрації вільного Na^+ і K^+ (табл. 3.10), які забезпечують діяльність захисної функції тканин статевих органів корів (68 і 19 мМ) свідчить, що її середні значення в 1,5 разу менші ніж тканин статевих органів бугаїв (104 і 29 мМ).

Вказана особливість концентрації Na^+ і K^+ характерна також для тканин генеративних органів, які утворюють яйцеклітини і забезпечують активне переміщення сперматозоїдів до місця їх ефективного контакту з яйцеклітиною. Виявили, що утворення яйцеклітин у паренхімі яйників корови відбувається за умов середовища, середні параметри концентрації Na^+ (97 мМ) і K^+ (36 мМ) якого в 1,5 і 1,8 разів менші, ніж паренхіми яєчок бугая (144 і 66 мМ), де відбувається утворення сперматозоїдів.

Таблиця 3.10

**Концентрація вільних іонів
у тканинах органів статевих систем (М, мМ)**

Функції	Стат. показник	Бугаї		Корови	
		Na^+	K^+	Na^+	K^+
I. Захисна	М	104	29	68	19
	lim	79...141	19...54	63...72	18...20
II. Генеративна	М	144	66	97	36
	lim	91...179	38...113	96...99	30...42
III. Транспортна	М	101	49	89	28
	lim	68...149	19...88	73...101	21...37
М із $\sum$ М I, II, III	М	112	48	85	28
	lim	101...144	29...66	68...97	19...36

Щоб забезпечити процес активного переміщення сперматозодів органами статевієї системи корови середовище цих тканин містить майже однакову з тканинами бугая концентрацію вільного Na^+ (101 проти 89 мМ), але K^+ (49 проти 28 мМ) – в 1,8 рази меншу.

Визначені у тканинах статевих органів бугая і корови параметри гомеостазу вільних іонів лужних металів вказують на те, що діяльність захисної й генеративної функцій тканин бугая забезпечують умови середовища за яких параметри концентрації Na^+ в 1,5 разу вищі, ніж тканин корови, але транспортної – однакові. Вказана різниця властива також для концентрації K^+ . Але її частка у тканинах органів бугаїв, які забезпечують діяльність захисної функції, – в 1,5, а тканин органів, які забезпечують діяльність генеративної й транспортної функцій, – в 1,8 разу вища, ніж корів. Виявлена невідповідність свідчить про важливу роль динаміки концентрації K^+ закритих систем типу “середовище - клітина” для регуляції перебігу процесів утворення сперматозоїдів і яйцеклітин, переміщення сперматозоїдів каналами і протоками органів статевієї системи та їх пенетрації в яйцеклітину.

Співвідношення концентрації $\text{Na}^+:\text{K}^+$. Важливим показником об’єктивного оцінювання впливу гомеостазу внутрішнього середовища тканин на функціональний стан сперматозоїдів є співвідношення концентрацій різнойменних пар іонів. Його величина характеризує роботу механізму іонних pomp. Тому аналіз динаміки концентрації Na^+ і K^+ у тканинах статевих органів, які виконують захисну, генеративну й транспортну функції, ілюструємо результатами аналізу співвідношень концентрації іонів вказаної пари (табл. 3.11).

Не зважаючи на те, що захисну функцію тканин статевих органів корів контролюють в 1,5 разу менші параметри концентрації вільного Na^+ і K^+ , ніж тканин статевих органів бугаїв, середній показник її відношень – однаковий і становить 3,6:1.

Виявлена особливість характерна також для парехіми яйників, середовище якої утворює яйцеклітини та паренхіми яєчок, міхурцевої і передміхурових залоз, середовище яких відповідно утворює сперматозоїди і спермальну плазму. Але числовий вираз співвідношень концентрації $\text{Na}^+:\text{K}^+$ у них на 1...2 частини вмісту Na^+ менший, ніж у тканинах, які виконують захисну функцію. З цього приводу слід зауважити таке. Зменшення на 1...2 частини величини співвідношень концентрації $\text{Na}^+:\text{K}^+$ зумовлене широким лімітом високих показників концентрації Na^+ і K^+ . У тканинах системи статевих органів бугаїв і корів мінімальні та максимальні параметри Na^+ становлять 91...179; K^+ – 30...113 мМ.

Таблиця 3.11

**Параметри відношень концентрації вільного $\text{Na}^+:\text{K}^+$
у тканинах статевих систем (М, ч.в.)**

Функції	Стат. показник	$\text{Na}^+:\text{K}^+$	
		бугаї	Корови
I. Захисна	М	3,6:1	3,6:1
	lim	2,6...4,2:1	3,5...3,6:1
II. Генеративна	М	2,2:1	2,7:1
	lim	1,6...2,4:1	2,4...3,2:1
III. Транспортна	М	2,1:1	3,2:1
	lim	1,7...3,6:1	2,7...3,5:1
М із $\sum$ М I, II, III	М	2:1	3:1
	lim	2...4:1	3...4:1

Ліміт відхилень від середніх значень числового виразу співвідношень концентрації $\text{Na}^+:\text{K}^+$ тканин статевих органів корови (піхва, шийка, тіло і роги матки), які створюють оптимальні умови для активного переміщення та ефективного контакту сперматозоїдів з яйцеклітиною, становить 2...4:1. Але величина співвідношень концентрації $\text{Na}^+:\text{K}^+$ тканин статевих органів бугая (сім'япрроводи та їх ампули, м'язи, корінь, тіло і головка прутня), залежно від виду тканин, на одну (3:1) чи на дві (4:1) частини вмісту Na^+ більші, або

співпадають (4:1) з числовим виразом співвідношень концентрації іонів у тканинах корови.

Вивільнення сперматозоїдів з тканин яєчок у головку і хвіст придатка та їх активне або пасивне переміщення з придатка сім'япроводом у його ампулу забезпечує середовище, тканини якого містять в 2...3 рази вищу концентрацію Na^+ , ніж K^+ . Накопичення і зберігання секретів сперми в ампулі сім'япроводу відбувається за однакового відношення їх концентрації (1:1). Однак визначений у ФВЕ тканин, піхви, тіла і рогів матки показник співвідношень концентрації вільного $\text{Na}^+:\text{K}^+$, свідчить про те, що тканини цих органів містять в 3...4 рази більше Na^+ , ніж K^+ .

Таким чином проведений аналіз визначених показників вказує на те, що ФВЕ тканин містять низьку і високу концентрацію вільних, легко-, міцнозв'язаних та недисоційованих форм іонів лужних металів. Сума ($\sum C_{1...4}$) її середніх значень, а саме: низької (5...9) і високої (10...14 мМ) Ca^{2+} ; низької (40...70) і високої (80...140 мМ) K^+ та низької (100...200) і високої (250...300 мМ) – Na^+ координує захисну, трофічну, генеративну і транспортну функції тканин статевих органів.

Відносний показник ліміту концентрації вільного Ca^{2+} становить 57...66, легкозв'язаного – 21...27, міцнозв'язаного – 5...7, недисоційованого – 6...10; K^+ – 43...57, 23...25, 11...16, 7...17; Na^+ – 46...62, 24...27, 10...1, 4...12 % від її визначеної суми ($\sum C_{1...4}$). Рівень концентрації Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у ФВЕ № 1...4 характеризує її низхідна ознака, а саме: $C_1 > C_2 > C_3 \geq C_4$. При цьому низька та висока концентрація вільних, легко-, міцнозв'язаних та недисоційованих форм створює у тканинах статевих органів гомеостаз іонів, середня величина числового виразу суми її співвідношень для різнойменної пари $\text{Na}^+:\text{K}^+$ (1...5:1) менша, ніж $\text{K}^+:\text{Ca}^{2+}$ (5...20:1), а $\text{K}^+:\text{Ca}^{2+}$ менша, ніж $\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$ (14...46:1), або інакше: числовий вираз відношень концентрації $\text{Na}^+:\text{K}^+ < \text{K}^+:\text{Ca}^{2+} < \text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$.

Визначені відносні параметри ліміту концентрації недисоційованих і міцно- (1...20), легкозв'язаних (21...30) та вільних (31...70 %) форм іонів вказують на те, що її низькі, середні і високі рівні виконують у тканинах

захисну (бар'єрну, буферну, компенсаторну) роль, що регулює стан рівноваги вмісту вільних іонів у системі "середовище - клітина". Це означає, що показники концентрації Ca^{2+} , K^+ , Na^+ та її співвідношень між парами іонів пов'язані з процесами, які забезпечують сперматозоїдо- і плазмогенез, транспорт утворених секретів сперми каналами і протоками органів статеві системи, рухливість і запліднювальну здатність сперматозоїдів.

Перелік публікацій до розділу 3, завдання 3.1.

1. Максимюк Г. В. Вміст і співвідношення Ca^{2+} , K^+ , Na^+ organa genitalia scrotum bovina / Г.В. Максимюк // Біологічні студії. – 2010. – Т.4, №2. – С. 91 – 96.
2. Межі концентрацій та співвідношень Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у тканинах статевих органів бугая / Г. В. Максимюк, В. М. Максим'юк, В. В. Бобрушко, О. Б. Дяченко // Передгірне та гірське землеробство і тваринництво. – 2010. – Вип. 52, ч. 1. – С. 162 – 168.
3. Максимюк Г. В. Баланс іонів лужних металів нативної сперми і тканин системи organa genitalia bovina / Г. В. Максимюк, З. Д. Воробець // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2010. – №4. – С. 19 – 27.
4. Максимюк Г. В. Деякі аспекти взаємозв'язку концентрації сперматозоїдів в еякулятах із концентрацією Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у тканинах статевих органів і спермі / Г. В. Максимюк, З. Д. Воробець // Вісник Дніпропетровського університету сер. Біологія. Медицина. – 2011. – Вип.2, т.1. – С. 81 – 87
<http://medicine.dp.ua/index.php/med/article/view/99>
5. Вільні та зв'язані іони солей лужних металів водних екстрактів тканин статевих органів / Г. В. Максимюк, З. Д. Воробець, В. М. Максим'юк, Л. Г. Левицька // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2013. – №3. – С. 25 – 38.
6. Максимюк Г. В. Вміст і співвідношення макроелементів в органах і тканинах статевої системи самців / Г. В. Максимюк, З. Д. Воробець // Світ медицини і біології. – 2013. – №1 (36). – С. 133 – 137.
7. Іони лужних металів тканин системи Organa genitalia masculina / В. М. Максимюк, Л. Г. Левицька, О. Б. Сушко, М. С. Савельєва, Г. В. Максимюк // Науково-технічний бюлетень ІТ НААН. – 2013 – №109, ч.1 – С. 189 – 196.

8. Максимюк Г. В. Іони солей лужних металів тканин системи organa genitalia masculine / Г.В. Максимюк // Міжнародна науково-практична конференція "Наукомісткі технології у сучасному тваринництві" 18-19 квітня 2013.: матер. конфер. – м. Харків, 2013. – С. 45.

9. Maksymjuk H. V. Relationship of ions homeostasis in sperm and germ tissues with sperm viability / H. V. Maksymjuk // VII Львівсько-Люблінська конференція "Сучасні аспекти експериментальної та клінічної біохімії" 23-24 травня 2013.: матер. конфер. – м. Львів, 2013. – С. 102.

10. Максимюк Г. В. Динаміка концентрацій Ca^{2+} , K^{+} , Na^{+} та її відношень між парами іонів у спермі та тканинах репродуктивних органів / Г.В. Максимюк // Міжнародна науково-практична конференція "Фармацевтичні та медичні науки: актуальні питання" 16-17 травня 2014.: матер. конфер. – м. Дніпропетровськ, 2014. – С. 67.

3.2. Особливості структури й функцій сперматозоїдів відкритої системи "середовище - клітина"

3.2.1. Стан акросоми й цитоплазматичної мембрани

Важливими ознаками, використання яких допоможе розкрити окремі аспекти механізму змін повноцінності будови сперматозоїдів за дії екзогенних чинників є визначення ступеня деструкції акросоми, цитоплазматичної мембрани й життєздатності клітин. Деструкція структури мембран, з одного боку призводить до змін життєздатності сперматозоїдів у системі "середовище - клітина", з іншого – до втрати їх природної здатності вступати в контакт з яйцеклітиною. Саме тому ці два ключові моменти стали підставою до вивчення особливостей "реакції - відповіді" незахищених і захищених кріопротекторами клітин нативної нерозрідженої та розрідженої сперми на дію екстремальних умов ТКС необлицьованими гранулами. Для досліджень, як модельну систему, використали свіжоотримані дуплетні еякуляти бугаїв високої якості (табл. 3.12).

Встановили, що свіжоотримані еякуляти нативної нерозрідженої сперми високої якості містять в середньому 82 % нормальних (рис. 3.3), 2 % юних (рис. 3.6.) та 16 % клітин із зміненою структурою їх акросоми й цитоплазматичної мембрани (рис. 3.5. а і рис. 3.5. б). Після чотиригодинного витримання НС у термостаті за 37 °С кількість клітин зі змінами мембран збільшується до 71 % (рис. 3.5). Визначений ступінь деструкції сперматозоїдів свідчить таке: якщо незахищені клітини витримувати за дії чинників етапу еквілібрації ($t = 4$ год, $T = 37$ °С), то структура 55 % сперматозоїдів нормальної форми зазнає деструктивних змін (рис. 3.4. а, 3.4 б). Після заморожування сперми до -196 °С та деконсервації гранул у 2,8 % розчині НЦ за 37 °С ще 20 % нормальних клітин зазнають деструктивних змін. Але слід зауважити, що після деконсервації гранул 9 % клітин все-таки залишається без видимих змін елементів їх екзоструктури.

Таблиця 3.12

**Вплив чинників ТКС на стан структури й функцій
сперматозоїдів ($M \pm m$)**

Об'єкти Досліджень	Стат. показ- ник	Сперма		
		нероз- ріджена	Після	
			еквілібра- ції	деконсер- вації
Деструкція мембран	%	16,05 $\pm$ 2,48	70,91 $\pm$ 3,29	91,11 $\pm$ 0,90
Рухливість сперматозоїдів	Бал	8,52 $\pm$ 0,19	3,63 $\pm$ 0,34	0,00
Кількість живих сперматозоїдів	%	67,39 $\pm$ 0,76	22,75 $\pm$ 4,01	М

Примітка. М – мертві сперматозоїди.

Визначені зміни показників життєздатності сперматозоїдів нативної сперми свідчать, що після дії чинників етапу еквілібрації сперми тільки 23 % живих (незабарвлених) клітин зберігають здатність до поступального прямолінійного руху, показник якого в середньому становить 3,63 бала. Після етапу деконсервації сперми головки усіх сперматозоїдів забарвлені у рожевий

колір (мертві), а деструктивні й нормальні клітини не проявляють ознак прямолінійного поступального руху.

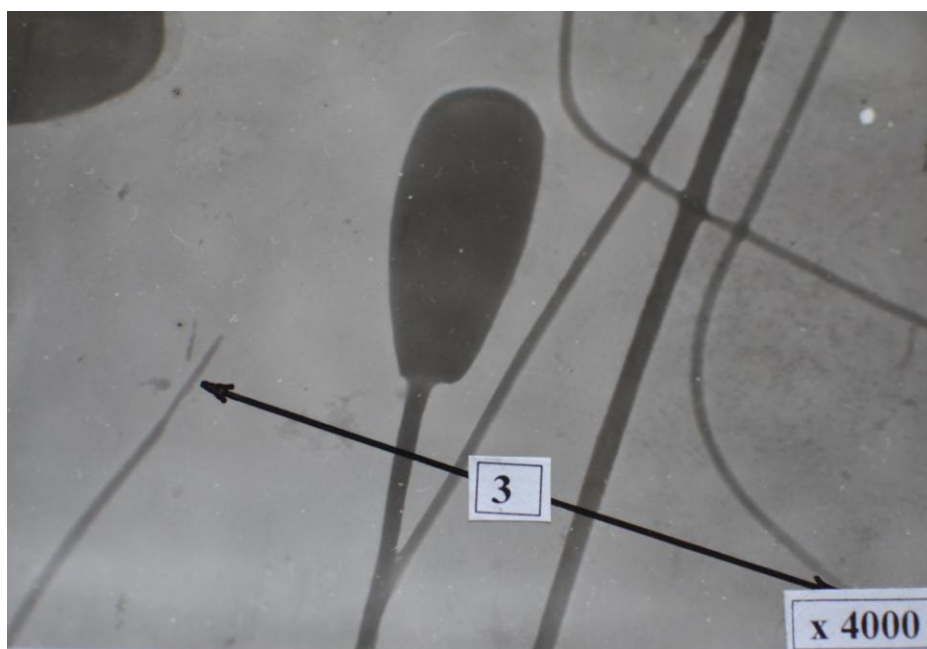
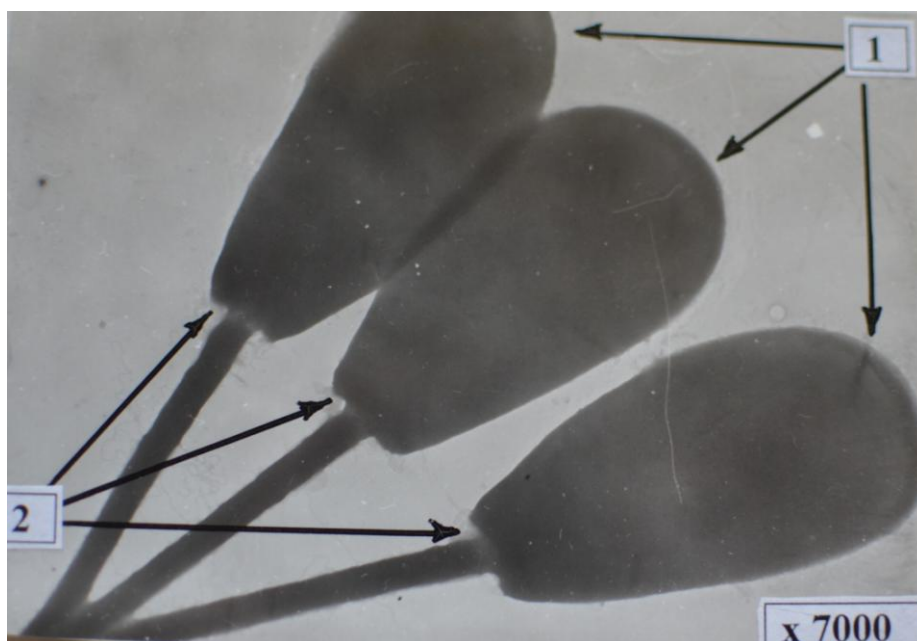


Рис. 3.3. Сперматозоїди нормальної або типової форми

Примітка: 1 – акросома щільно прилягає до головки; 2 – цитоплазматична мембрана шийки без розривів і просвітів; 3 – кінець хвоста гострий, не закручений у кільця різної форми, не розходить на осьові нитки.

Деструктивні зміни головки, тіла і хвоста сперматозоїдів

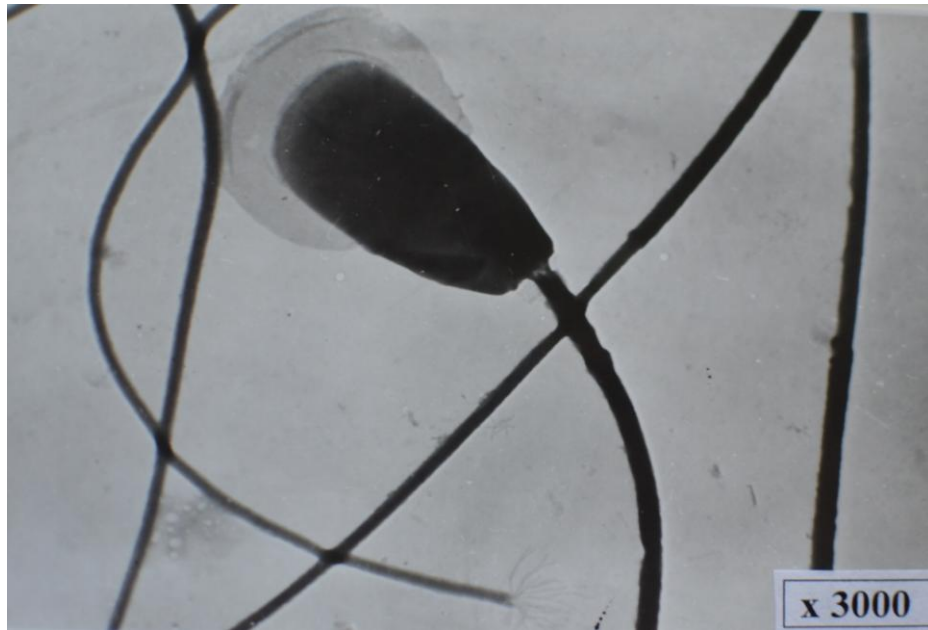


Рис. 3.4а. Акросома сперматозоїдів набухає.

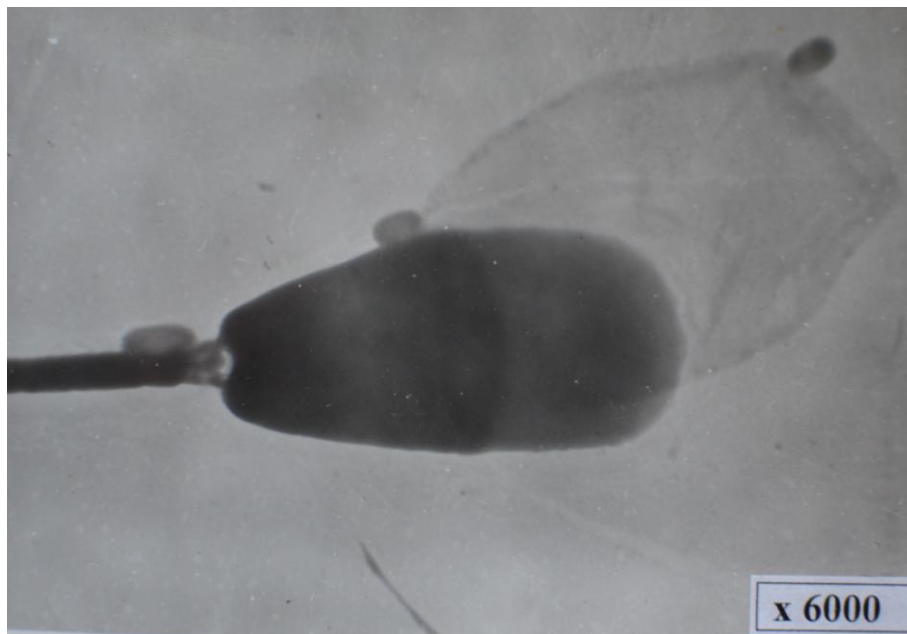


Рис. 3.4б. Акросома сперматозоїдів сповзає з головки.

