

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН**

МАКСИМЮК ГАННА ВАСИЛІВНА

УДК 577.128:115.3:616.2:612.015

**БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ
ТРАНСМЕМБРАННИХ ЗМІН ГОМЕОСТАЗУ ІОНІВ
НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ СПЕРМАТОЗОЇДІВ
ЗА УМОВ КРІОПРОТЕКЦІЇ**

03.00.04 – біохімія

**АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук**

Львів – 2016

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького МОЗ України.

Науковий консультант – доктор біологічних наук, професор
Воробець Зіновій Дмитрович,
Львівський національний медичний університет
імені Данила Галицького,
завідувач кафедри медичної біології,
паразитології та генетики.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор,
академік НАН України
Костерін Сергій Олексійович,
Інститут біохімії імені О. В. Палладіна
НАН України,
завідувач відділу біохімії м'язів,
заступник директора з наукової роботи;

доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Стойка Ростислав Стефанович,
Інститут біології клітини НАН України,
завідувач відділу регуляції
проліферації клітин та апоптозу;

доктор біологічних наук, професор
Жегунов Геннадій Федорович,
Харківська державна зооветеринарна академія,
завідувач кафедри хімії і біохімії.

Захист відбудеться " 1 " березня 2016 р. о " 10⁰⁰ " годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 35.368.01 Інституту біології тварин НААН за адресою: 79034, м. Львів, вул. В. Стуса, 38.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біології тварин НААН за адресою: 79034, м. Львів, вул. В. Стуса, 38.

Автореферат розісланий " _____ " січня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

О. І. Віщур

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Експериментальні дослідження особливостей біохімічних змін нативного стану структури й функцій сперматозоїдів, результати яких спрямовано на виявлення особливостей механізмів адаптивної реакції статевих клітин за дії чинників моно- і полікомпонентних захисних середовищ (ЗС) та технології кріоконсервації сперми (ТКС) до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, сьогодні особливо актуальні.

Сумарна дія впроваджених у практику сучасних способів (технологія) і засобів (кріопротектори) захисту забезпечує збереження лише 30 – 35 % функціонально повноцінних статевих клітин у деконсервованих спермодозах. Крім цього, сперматозоїди деконсервованих спермодоз мають знижені майже вдвічі щодо нативної сперми показники рухливості й запліднювальної здатності (Бугров А. Д., 2010; Линник Т. П., 2010; Науменкова В. А., 2012). Зважаючи на це, важливими 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 мінімізувати негативну дію чинників ТКС на функціональну повноцінність сперматозоїдів у деконсервованих спермодозах та підвищити ефективність і рентабельність роботи біотехнологічних центрів репродукції людини і тварин.

Як відомо, внутрішньоклітинний гомеостаз Ca^{2+} , K^{+} , Na^{+} досягається завдяки складній і координованій системі їх пасивного й 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 "середовище – клітина", координують перебіг фізичних та біохімічних процесів, які ініціюють рухливість, капаситацію й акросомну реакцію сперматозоїдів, формують на їх мембранах електрохімічний градієнт концентрації іонів (Герасимов А. М., 2003; Жабин С. Г., 2005; Кочешкова Н. С., 2006). Зміна активності Ca^{2+} -транспортних систем корегує внутрішньоклітинний гомеостаз Ca^{2+} ізольованих клітин, а також K^{+} і Na^{+} тканин статевих органів самок (Magnus O., 1990; Suarez S., 2007; Костерин С. А., 2008).

Результати детального вивчення особливостей енергозалежного й незалежного трансмембранного переміщення іонів лужних металів у відкритих і закритих системах, що запускає механізми рухливості сперматозоїдів, акросомальної реакції, пенетрації та запліднення яйцеклітини, допоможуть не лише з'ясувати окремі ланки адаптивної реакції на вплив екзогенних чинників, але й відкорегувати стан динамічної рівноваги вмісту іонів неорганічних і молекул органічних хімічно активних сполук 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 пенетрації сперматозоїдів у яйцеклітину (Cerolini S., 2001; Shadan S., 2004; van Gestel R. A., 2006; Martinez P., 2007; Гула Н. М., 2009; Argov-Argaman N., 2013).

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, які відбуваються у клітинах тканин статевих органів самця (інтерстиціальні клітини, клітини Сертолі, сперматогонії). Ці мультифункціональні сполуки беруть активну участь у передаванні внутрішньоклітинних сигналів, регулюють ріст і диференціацію зародкових клітин, репродуктивну та нейроендокринну функції, забезпечують процеси сперматогенезу (Nandipati K. S., 2005). 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 (Божедомов В. А., 2004; Айзикович Б. И., 2008; Порошина Т. В., 2010; Martinez P., 2010).

Сучасні технології кріоконсервації сперми все ще потребують фундаментальних методів розв'язання вказаних проблем. Об'єктивне оцінювання ступеня змін структури (акросома, цитоплазматична мембрана) та функцій (гомеостаз іонів і молекул біологічно активних речовин) сперматозоїдів забезпечує визначення абсолютних і відносних показників їх динаміки 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). З цією метою ми розробили, апробували, стандартизували й адаптували у дослідний процес низку власних методик та способів аналізу виконаних досліджень (Максимюк Г. В., 2005, 2010, 2011, 2012).

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

Дисертаційну роботу виконували в Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького у межах науково-дослідної теми за 2011 – 2015 рр.: "Дослідження функціонально-метаболических резервів стреслімітуючих систем організму за екстремальних умов з метою виявлення ефективних способів їх корекції" (ДР № 0111U000121). В спермальній плазмі та сперматозоїдах еякулятів плідних і неплідних чоловіків автор вивчала особливості змін вмісту іонів лужних металів, активності транспортних АТФаз, концентрації інтерлейкінів.

Виконані в лабораторії відтворення тварин Інституту сільського господарства Карпатського регіону НААН дослідження в 2006 – 2010 рр. є частиною науково-дослідної роботи завдання 25.02.02-008 Ф "Розробити нові біотехнологічні методи оцінки функціональної повноцінності сперматозоїдів свіжоотриманої і кріоконсервованої сперми" (ДР № 0106U003850), а в 2011 – 2013 рр. – частиною завдань 23.02.01.20 П теми "Розробити методологію вивчення особливостей гомеостазу в тканинах статевих органів бугаїв та виділеної ними сперми" (ДР № 0111U005339) і 23.02.01.14 П теми "Розробити систему комплексної оцінки життєздатності сперматозоїдів нативної і кріоконсервованої сперми за біохімічними

показниками" (ДР № 0111U005340). При проведенні цих досліджень вивчено особливості реакції сперматозоїдів на дію екзо- та ендогенних чинників.

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – з'ясувати особливості біохімічних і фізико-хімічних змін іонного, жирнокислотного, цитокінового гомеостазу й активності транспортних АТФаз у відкритих і закритих системах "середовище – сперматозоїди" за умов кріоконсервації.

Для реалізації поставленої мети визначено такі основні завдання:

- розробити методiku та способи оцінювання особливостей трансмембранних змін гомеостазу іонів лужних металів, молекул насичених і ненасичених, етерифікованих і неетерифікованих форм ЖК, активності транспортних АТФаз, концентрації про- і протизапальних інтерлейкінів у спермі;

- дослідити розподіл концентрації Ca^{2+} , K^+ , Na^+ між спермальною плазмою і сперматозоїдами та зміни 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;

- з'ясувати розподіл концентрацій ЖК 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 ТКС;

- обґрунтувати механізм збереження структури та функцій сперматозоїдів за дії певних ендо- і екзогенних чинників;

- запропонувати модель оцінювання особливостей змін нативного стану структури й функцій сперматозоїдів, яка здатна мінімізувати шкодочинну дію моно- та полікомпонентних ЗС, і створити нові, більш ефективні розріджувачі сперми.

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

Методи дослідження: концентрацію іонів лужних металів визначали за допомогою методу полуменевої фотометрії (Flapho-4), концентрацію сперматозоїдів у еякулятах – електрофотокolorиметрії (КФК-3), їх рухливість і виживання оцінювали методами світлової мікроскопії (Биолам), стан структури акросоми й цитоплазматичної мембрани – електронної мікроскопії (УЕМВ-100К), активність транспортних АТФаз – спектрофотометрії (СФ-26); концентрацію ЖК – газової хроматографії (Chrom-5); концентрацію інтерлейкінів – імуноферментного аналізу (Stat-fax 303). Ступінь абсолютних і відносних змін переміщеного вмісту іонів лужних металів визначали математичними обчисленнями. Для статистичного аналізу результатів досліджень використали програму Microsoft Excel.

Внесені до методик модифікації визначення показників спермальної плазми, сперматозоїдів і сперми докладно описано в розділі "Матеріали і методи дослідження".

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше визначено ліміти й 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; виявлено їх тісний зв'язок із повноцінністю структури та функцій сперматозоїдів нативної і кріоконсервованої сперми.

Уперше 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 і неетерифікованих форм ЖК у спермальній плазмі та сперматозоїдах.

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

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

З'ясовано, що стан структури акросоми та цитоплазматичної мембрани сперматозоїдів типової форми, їх життєздатність і запліднювальна здатність у еякулятах із низькою й високою концентрацією K^+ зазнає більших змін, ніж із середньою.

Доведено, що у відкритих системах, 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 постійно виділяти еякуляти з індивідуально стабільними показниками концентрації K^+ та з низькою і високою стійкістю мембран сперматозоїдів до дії чинників ТКС можна успішно використовувати для корекції змінених 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 висока активність транспортних АТФаз у перфорованих мембранах сперматозоїдів свідчать про те, що їх можна використовувати для визначення рівня запліднювальної здатності сперматозоїдів.

Встановлені ліміти концентрації ненасичених ЖК (лінолева, ліноленова й арахідонова) та їх здатність за низьких (-5 – -49 °С) температур переходити з твердої фази в рідку доцільно 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 їх переміщення каналами і протоками органів статевих систем самців і самок.

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

Спільно з працівниками лабораторій Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького та Львівського національного університету імені Івана Франка виконала серію електронно-мікроскопічних досліджень, спрямованих на визначення ступеня деструкції сперматозоїдів за дії екзогенних чинників; Інституту сільського господарства Карпатського регіону НААН – з визначення концентрації іонів лужних металів, насичених і ненасичених етерифікованих і неетерифікованих форм ЖК у спермі.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи оприлюднені 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-му 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 – Чикаго, 2014); Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014); "Ключові питання наукових досліджень у сфері медицини у ХХІ ст." (Одеса, 2015); "Развитие науки в ХХІ веке" (Харків, 2015).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 44 праці: 19 статей у наукових журналах, 5 – у збірниках, 3 – у закордонних журналах (з них 7 – у наукометричних базах), 13 – у тезах конференцій. У співавторстві видано 3 методичні розробки, отримано 1 патент на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень та їх обговорення, висновків, списку використаних джерел. Усього опрацьовано 560 найменувань, з них 252 – латиницею. Основний зміст дисертації викладено на 302 сторінках друкованого тексту. Робота містить 76 таблиць, 17 рисунків, 7 формул.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Вступ. Охарактеризовано наукову проблему виконаної роботи, обґрунтовано актуальність теми, сформульовано мету і завдання досліджень, визначено теоретичну новизну та практичне значення її результатів.

Огляд літератури. Матеріал викладений у 5 підрозділах, докладно висвітлює дані щодо особливостей концентрації, її співвідношень і активності біологічно активних сполук спермальної плазми та сперматозоїдів людини й тварин і тканин статевих органів бугаїв та корів, аналізує зміни повноцінного стану структури й функцій сперматозоїдів нативної та кріоконсервованої сперми за дії екзо- та ендогенних чинників.

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

Сперму 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 тканин статевих органів бугаїв ($n = 5$) і корів ($n = 5$).

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), директив Ради Європи 86/609/ЕЕС (1986), 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 (2001). Дослідження проведені згідно з існуючими нормативами, про що свідчить протокол № 10 від 15 грудня 2014 р. комісії з біоетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

Експериментальну роботу виконували на базі 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; лабораторії 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 структуру й функції сперматозоїдів за дії екзо- та ендогенних чинників використовували зразки спермальної плазми і сперматозоїдів еякулятів чоловіків та бугаїв, ФВЕ тканин статевих органів бугаїв і корів.

У спермі неплідних чоловіків, за дії ендогенних чинників, вивчали особливості гомеостазу іонів лужних металів, активності транспортних АТФаз та концентрації про- і протизапальних інтерлейкінів. У спермі бугаїв високої якості, за дії екзогенних чинників, досліджували особливості гомеостазу іонів лужних металів та молекул насичених і ненасичених, етерифікованих і неетерифікованих ЖК. У ФВЕ тканин статевих органів, за дії ендогенних чинників (віковий і функціональний аспекти впливу), – особливості гомеостазу Ca^{2+} , K^+ , Na^+ (рис. 1).



Рис. 1. Схема оцінювання впливу ендо- та екзогенних чинників на повноцінність стану структури й функцій сперматозоїдів чоловіків та бугаїв

Динаміку рухливості сперматозоїдів визначали візуально за десятибальною шкалою, кількості живих і мертвих – за допомогою методу диференційного фарбування, тривалості виживання – світлової мікроскопії, концентрації сперматозоїдів – фотоелектроколориметрії, враховуючи вимоги держстандартів (ГОСТ 20909.3–75 та ГОСТ 20909.6–75 [SU]).

Кріоконсервацію сперматозоїдів проводили згідно з існуючими вимогами до ТКС необлицьованими гранулами (Осташко Ф. І., 1995). Особливості змін екзоструктури сперматозоїдів (Максимюк Г. В., 2005) та гомеостазу іонів і способу їх переміщення в системі "середовище – клітина" вивчали, враховуючи вимоги розроблених нами методик (Максимюк Г. В., 2011, 2012); активність транспортних АТФаз у перфорованих мембранах сперматозоїдів – за методиками (Петруняка В. В., 1990 та модифікованої і стандартизованої Максимюк Г. В., 2010), концентрацію ЖК – за методикою (Рівіс Й. Ф., 1997). У зразках спермальної плазми, згідно з вимогами 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).

Математичну обробку та аналіз експериментальних даних здійснювали за допомогою програми Excel (Microsoft, USA). Між дослідними і контрольною групами за критерієм Стьюдента (t) знаходили ймовірність похибки (P) визначених показників ($M \pm m$). Зміни вважали вірогідними, якщо $P < 0,05 - 0,001$. Для окремих показників обчислювали критерій детермінованості досліджуваних ознак (r).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Гомеостаз іонів лужних металів

Результати виконаних завдань першого етапу досліджень свідчать, що еякуляти високої якості, фізіологічно здорових бугаїв ($n = 68$), дослідних груп І (НКК, 19 %), ІІ (СКК, 59 %) і ІІІ (ВКК, 22 %) віком 2 – 9 років мають індивідуальну, постійно низьку (17 – 27 мМ), середню (36 – 43 мМ) або високу (60 – 66 мМ) концентрацію K^+ (рис. 2).

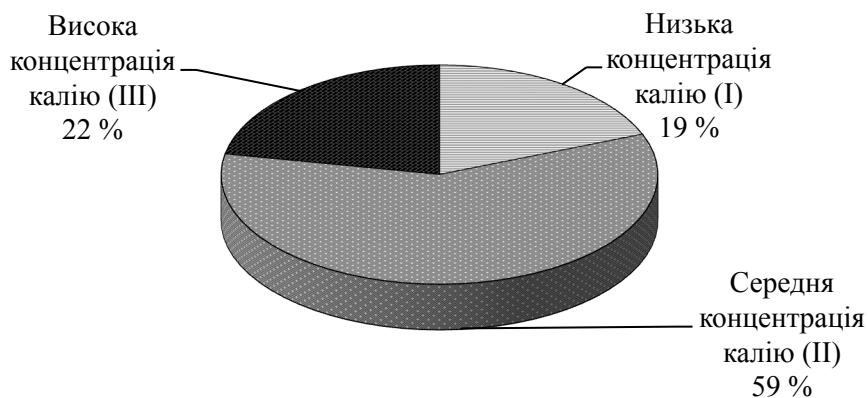


Рис. 2. Групи бугаїв досліджуваної вибірки ($n = 68$)

Визначений у еякулятах високої якості розподіл концентрацій іонів між спермальною плазмою і сперматозоїдами показує, що мінімальна й максимальна концентрація Ca^{2+} у спермальній плазмі бугаїв усіх трьох груп не виходить за межі 7 – 8 мМ. У сперматозоїдах вона в 4 рази менша – 1,6 – 2,0 мМ (рис. 3а). Однак, якщо у спермальній плазмі (6,3 – 7,5 мМ) і сперматозоїдах (1,7 – 1,8 мМ) відхилення

мінімальних і максимальних лімітів концентрації Ca^{2+} незначні, то K^+ – зростають від групи НКК до ВКК (рис. 3б). Виявлена невідповідність її середніх значень у спермальній плазмі становить 15, 23, 47 мМ, у сперматозоїдах – 6, 11, 15 мМ, що в 2,5, 2,1, 3,1 разу, відповідно більше. Найвищий показник концентрації K^+ властивий еякулятам бугаїв групи ВКК.

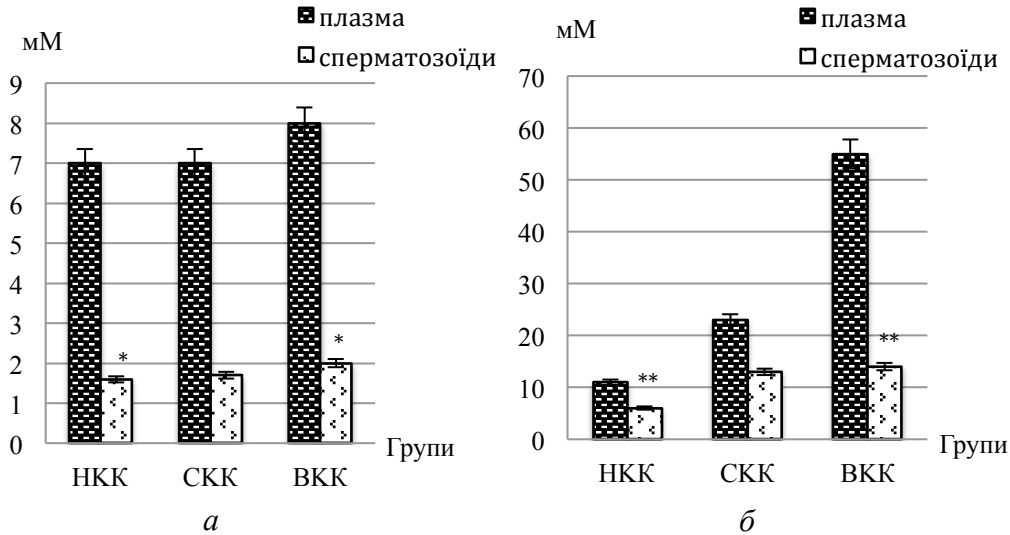


Рис. 3. Концентрація Ca^{2+} (а) і K^+ (б) спермальної плазми та сперматозоїдів еякулятів бугаїв, мМ (n = 690).

Примітка. Тут і далі різниці вірогідні порівняно з контролем: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$.

Середнє значення концентрації Na^+ (рис. 4) спермальної плазми (81, 70, 52 мМ) в 3,9, 3,9, 3,7 разу нижче, ніж сперматозоїдів (21, 18, 14 мМ). Її високі значення властиві еякулятам групи НКК, середні – СКК, низькі – ВКК.

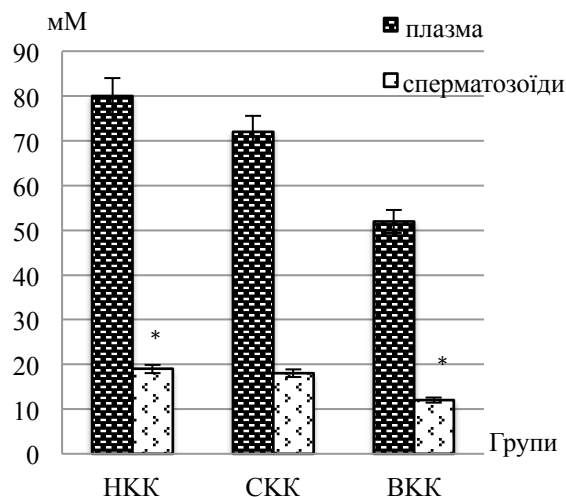


Рис. 4. Концентрація Na^+ спермальної плазми та сперматозоїдів еякулятів бугаїв, мМ (n = 690)

Визначені ліміти концентрації іонів зумовлюють відповідні рівні їх рівноважного стану в спермальній плазмі, сперматозоїдах та між ними (табл. 1). Наявність у спермальній плазмі та сперматозоїдах індивідуально низької, середньої та високої концентрації K^+ зумовлює неоднакові співвідношення концентрації різно- та однойменних пар іонів у спермі. Якщо числові вирази співвідношень концентрації $Na^+:Ca^{2+}$ і $Na^+:K^+$ у спермальній плазмі та сперматозоїдах еякуляторів бугаїв дослідних груп I, II, III зменшуються від групи НКК до ВКК, то $K^+:Ca^{2+}$ – збільшуються.

Таблиця 1

Співвідношення концентрації іонів спермальної плазми, сперматозоїдів та системи "спермальна плазма – сперматозоїди", числові вирази (n = 690)

Група бугаїв	Пари іонів, об'єкти досліджень					
	різнойменні			однойменні		
	$Na^+:Ca^{2+}$	$K^+:Ca^{2+}$	$Na^+:K^+$	$Ca^{2+}:Ca^{2+}$	$K^+:K^+$	$Na^+:Na^+$
спермальна плазма						
НКК	11:1	2:1	5:1	–	–	–
СКК	11:1	4:1	3:1	–	–	–
ВКК	8:1	6:1	1:1	–	–	–
сперматозоїди						
НКК	12:1	3:1	4:1	–	–	–
СКК	11:1	6:1	2:1	–	–	–
ВКК	8:1	8:1	1:1	–	–	–
"спермальна плазма – сперматозоїди"						
НКК	45:1	9:1	14:1	4:1	3:1	4:1
СКК	41:1	16:1	6:1	4:1	2:1	4:1
ВКК	32:1	26:1	4:1	4:1	3:1	4:1

Подібну залежність встановлено для показника, який характеризує особливості гомеостазу іонів між спермальною плазмою та сперматозоїдами. Співвідношення концентрації $Na^+:Ca^{2+}$ (32, 41, 45:1) зумовлюють в 3,7 – 4 рази більшу межу їх змін, ніж у спермальній плазмі (8, 11, 11:1) та сперматозоїдах (8, 11, 12:1). Межа змін співвідношень концентрації $K^+:Ca^{2+}$ (9, 16, 26:1 проти 2, 4, 6:1 і 3, 6, 8:1) та $Na^+:K^+$ (4, 6, 14:1 проти 1, 3, 5:1 і 1, 2, 4:1) – суттєво ширша. Діапазон відхилень їх мінімальних і максимальних значень у 2,7 – 4,5 і 2 – 4 рази відповідно більший.

Співвідношення концентрації однойменних пар $Ca^{2+}:Ca^{2+}$ і $Na^+:Na^+$ між спермальною плазмою і сперматозоїдами в еякуляторах високої якості стабільно однакові. В усіх випадках її числові вирази становлять 4:1. За цих умов співвідношення концентрації $K^+:K^+$ (3, 2, 3:1) на 1 – 2 частини вмісту менше, ніж $Ca^{2+}:Ca^{2+}$ (4, 4, 4:1) і $Na^+:Na^+$ (4, 4, 4:1).

Гомеостаз молекул жирних кислот

Спермальна плазма. Відомо, що інтенсивність біохімічних процесів у спермі залежить від параметрів концентрації та стану молекул ЖК (Martinez-Soto J. C., 2013). На ступінь їх захисного ефекту впливають температура плавлення, маса і довжина

вуглеводневого ланцюга, кількість атомів водню у молекулах. Вони ініціюють перебіг процесів кристалізації органічних і неорганічних речовин у мембранах сперматозоїдів, зумовлюють неоднакову стійкість компонентів їх структури до дії чинників ТКС. Тому наступний етап запланованих досліджень стосувався визначення лімітів концентрації насичених і ненасичених, етерифікованих і неетерифікованих форм ЖК у спермальній плазмі та сперматозоїдах.

Виявлено, що ліміти концентрації насичених (0,2 – 8 мг%) етерифікованих форм ЖК у спермальній плазмі в 3 – 5 разів менші, ніж насичених (0,5 – 24 мг%) неетерифікованих (рис. 5). Із наведеної вибірки ЖК у спермальній плазмі еякулятів бугаїв дослідних груп найвищі показники концентрації неетерифікованих і етерифікованих форм мають пальмітинова (17 – 24 і 5 – 8 мг%) і стеаринова (10 – 14 і 3 – 5 мг%). Якщо низька концентрація пальмітинової кислоти властива спермальній плазмі еякулятів груп СКК і ВКК, то стеаринової – груп НКК і СКК.

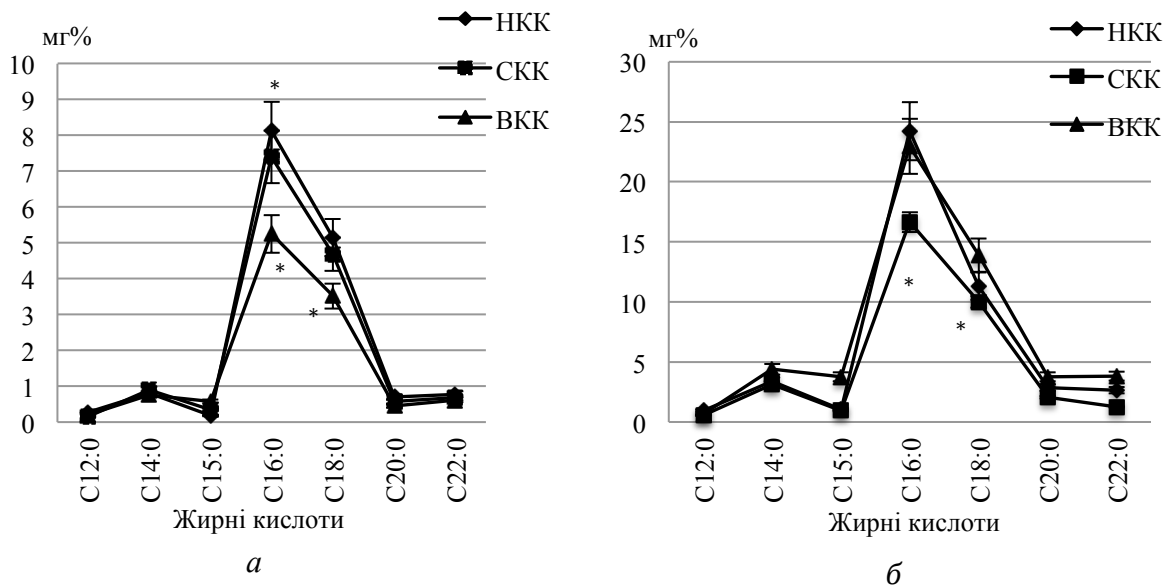


Рис. 5. Вміст насичених етерифікованих (а) і неетерифікованих (б) жирних кислот спермальної плазми еякулятів бугаїв, мг% (n = 15)

Примітка Тут і на рис. 7. C_{12:0} – лауринова, C_{14:0} – міристинова, C_{15:0} – пентадеканова, C_{16:0} – пальмітинова, C_{18:0} – стеаринова, C_{20:0} – арахінова, C_{22:0} – бегенова.

Ліміти концентрації ненасичених етерифікованих (1,3 – 29 мг%) і неетерифікованих (1,2 – 32 мг%) кислот співпадають (рис. 6). Водночас, якщо спермальна плазма еякулятів дослідних груп містить низьку концентрацію пальмітоолеїнової і арахідонової кислот (1 – 7 мг%), то олеїнової, лінолевої і ліноленової – високу (8 – 32 мг%).

До характеристики наведеної особливості слід додати, що високий рівень концентрації етерифікованих (20 – 28 мг%) і неетерифікованих (27 – 32 мг%) форм олеїнової кислоти властивий спермальній плазмі еякулятів усіх дослідних груп, але лінолевої (27 мг%) і ліноленової (26 мг%) – лише неетерифікованим формам ЖК в еякулятах групи НКК. Ліміт мінімальної та максимальної концентрації етерифікованих і неетерифікованих форм цих кислот у спермальній плазмі еякулятів груп СКК і ВКК у середньому становить 9 – 18 мг%.

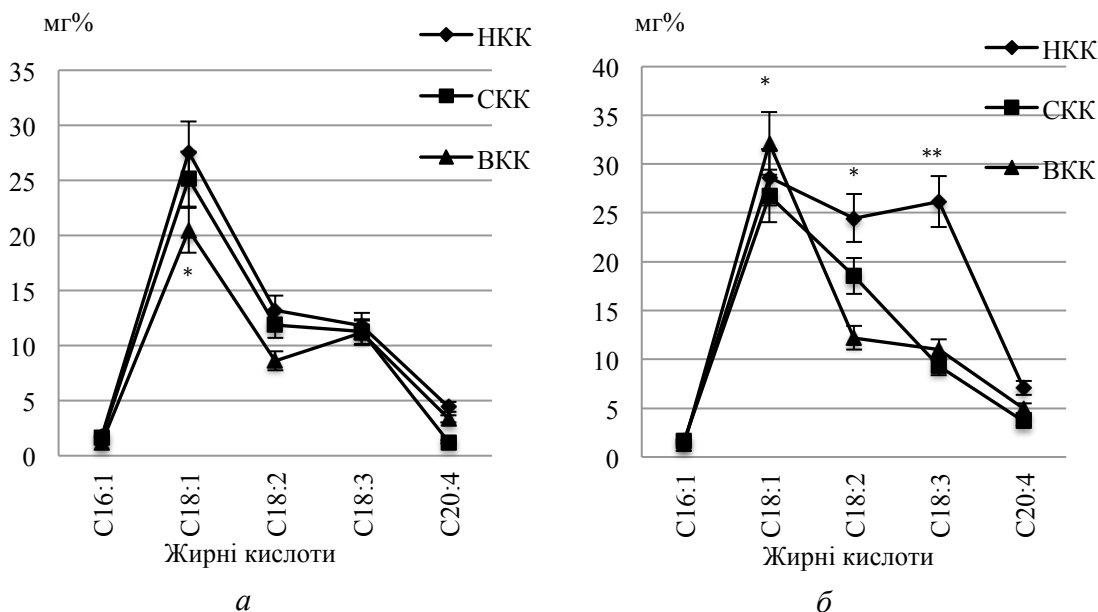


Рис. 6. Вміст ненасичених естерифікованих (а) і неестерифікованих (б) жирних кислот спермальної плазми еякулятів бугаїв, мг% (n = 15)

Примітка Тут і на рис. 8. C_{16:1} – пальмітоолеїнова, C_{18:1} – олеїнова, C_{18:2} – лінолева, C_{18:3} – ліноленова, C_{20:4} – арахідонова.

Імовірно, що наявність високих показників концентрації олеїнової, лінолевої й ліноленової кислот залежить від кількості (n = 1, 2, 3) подвійних зв'язків у їх молекулах. Це припущення ілюструє динаміка параметрів концентрації олеїнової кислоти в групі НКК, значення якої знижується від 29 до 26, у СКК – від 27 до 9, а у ВКК – від 32 до 11 мг%. Вірогідна різниця концентрації ЖК C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18:3} зафіксована в спермальній плазмі еякулятів групи СКК (25 – 27, 11 – 19, 11 – 9 мг%) щодо груп НКК (28 – 29, 13 – 27, 4 – 7 мг%) і ВКК (20 – 32, 9 – 12, 11 – 12 мг%) відповідно.

Наведені результати дають підстави припустити, що низькі, середні й високі рівні концентрації іонів лужних металів у спермі можуть перебувати у зв'язку з низькими та високими параметрами концентрації насичених і ненасичених форм ЖК у спермальній плазмі.

Сперматозоїди. Характерною ознакою концентрації насичених неестерифікованих форм кислот у мембранах сперматозоїдів (рис. 7) еякулятів групи НКК (0,2 – 5 мг%) є наявність у 5 разів нижчих її лімітів, ніж у спермальній плазмі (1 – 24 мг%). Однак ліміти концентрації естерифікованих форм – майже однакові (0,3 – 5 проти 0,3 – 8 мг%). У сперматозоїдах групи ВКК вони відповідно в 2 – 5 (0,3 – 6 і 0,2 – 3 проти 0,7 – 23 і 0,2 – 5 мг%), а у групі СКК (0,3 – 2 і 0,2 – 2 проти 0,6 – 17 і 0,2 – 7 мг%) – в 2 – 9 разів відповідно нижчі, ніж у спермальній плазмі. Слід зазначити, що у спермальній плазмі (4 – 24 проти 0,2 – 4 мг%) і сперматозоїдах (2 – 6 проти 0,2 – 2 мг%) концентрація неестерифікованих і естерифікованих форм пальмітинової та стеаринової кислот у 2 – 4 рази вища, ніж лауринової, міристинової, пентадеканової і бегенової.

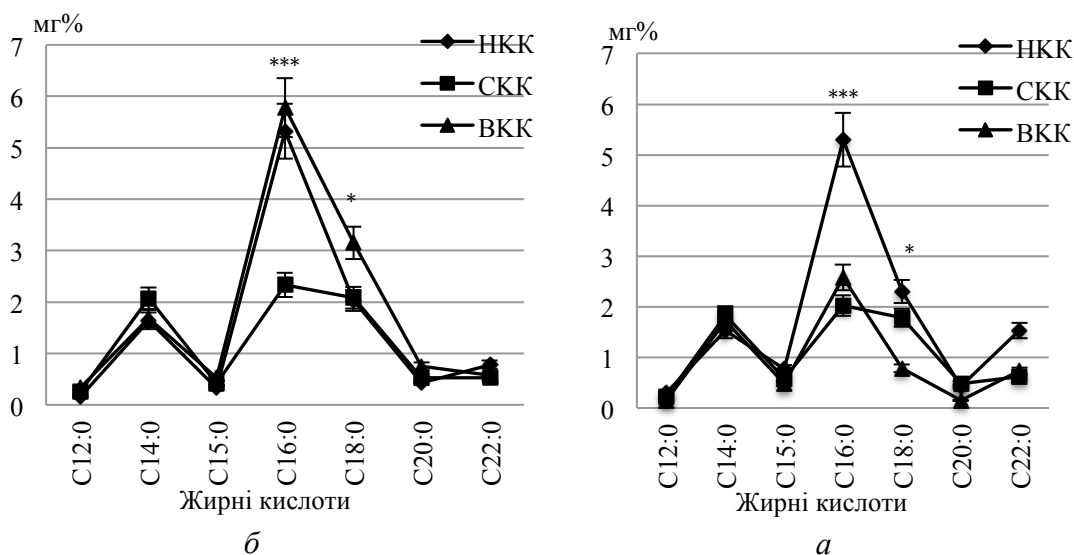


Рис. 7. Вміст насичених етерифікованих (а) і неетерифікованих (б) жирних кислот у сперматозоїдах еякулятів бугаїв, мг% (n = 15)

Ліміти концентрації ненасичених етерифікованих (0,2 – 9 мг%) і неетерифікованих (0,4 – 5 мг%) форм ЖК у мембранах сперматозоїдів у 3 – 6 разів (рис. 8) нижчі, ніж у секретах спермальної плазми (1 – 28 і 1 – 32 мг%). Якщо у секретах спермальної плазми (11 – 32 мг%) високу концентрацію визначили для олеїнової, лінолевої та ліноленової кислот, то у мембранах сперматозоїдів (2 – 9 мг%) – лише для олеїнової та лінолевої. Ліміти концентрації олеїнової й лінолевої кислот у середньому становлять $\pm 2 - 5$ мг%, а пальмітинової, ліноленової і арахідонової – < 2 мг%.

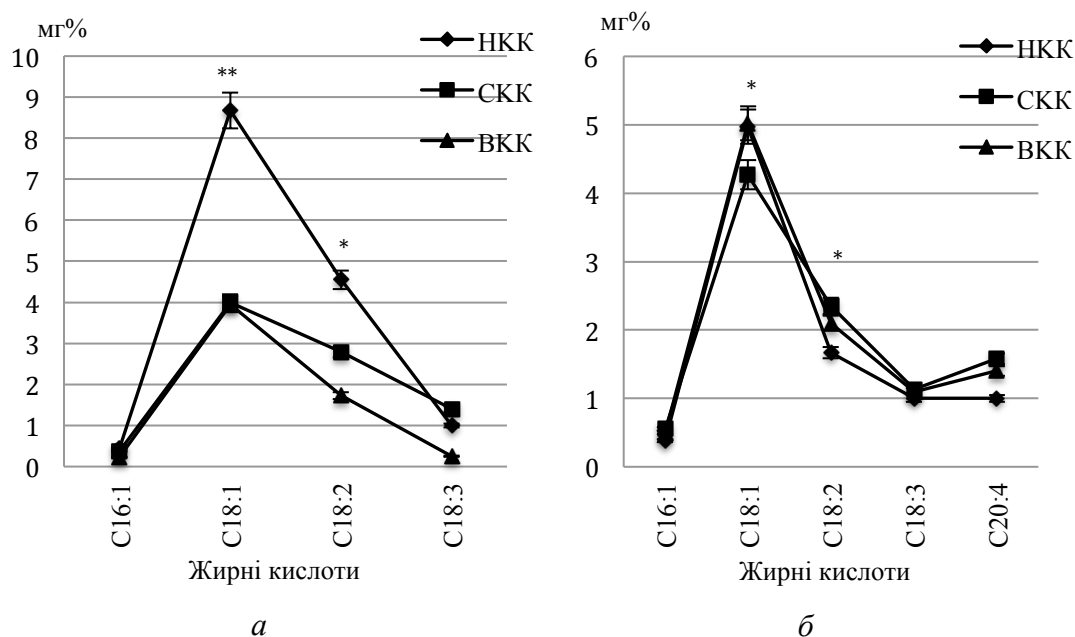


Рис. 8. Вміст ненасичених етерифікованих (а) і неетерифікованих (б) жирних кислот у сперматозоїдах еякулятів бугаїв, мг% (n = 15)

Виявлена особливість динаміки концентрації ЖК у складових сперми високої якості свідчить про те, що наявність у спермальній плазмі та мембранах сперматозоїдів еякулятів бугаїв групи НКК вищих, а у групі ВКК нижчих параметрів насичених форм пальмітинової, стеаринової та ненасичених – олеїнової, лінолевої й ліноленової кислот, ніж у еякулятах групи СКК, може бути причиною різної стійкості мембран сперматозоїдів до негативної дії фізичних і хімічних чинників екстремальних умов ТКС.

Гомеостаз вільних іонів у тканинах статевих органів самців і самок

Базовим ендogenous чинником, який формує, і, залежно від обставин, може мати негативний або позитивний вплив на повноцінність структури та функцій сперматозоїдів, є гомеостаз іонів і молекул біологічно активних речовин у закритих системах "середовище – клітина". Для дослідження особливостей його динаміки, як моделі, використали ФВЕ тканин систем статевих органів самців 12 – 18-місячного і самок 2, 6 і 10-річного віку чорно-рябої голштинської породи. Зразки тканин об'єднали у три дослідні групи. До першої групи віднесли органи, тканини яких виконують захисну функцію (бугай – калитка, підймач яєчка, препуцій; корова – піхва, статеві губи), до другої – органи, тканини яких виконують генеративну функцію (бугай – яєчко, придаток, міхурцева і передміхурова залози; корова – яйники), до третьої – органи, тканини яких виконують транспортну функцію (бугай – сім'япровід, ампула сім'япроводу, прутень; корова – роги і тіло матки).

Результати виконаних досліджень свідчать про те, що генеративну, транспортну і захисну функції тканин статевих органів бугаїв і корів контролюють високі (144 – 97 і 66 – 36 мМ), середні (101 – 89 і 49 – 28 мМ) та низькі (104 – 68 і 29 – 19 мМ) рівні концентрації вільного Na^+ і K^+ (рис. 9). В усіх випадках концентрація

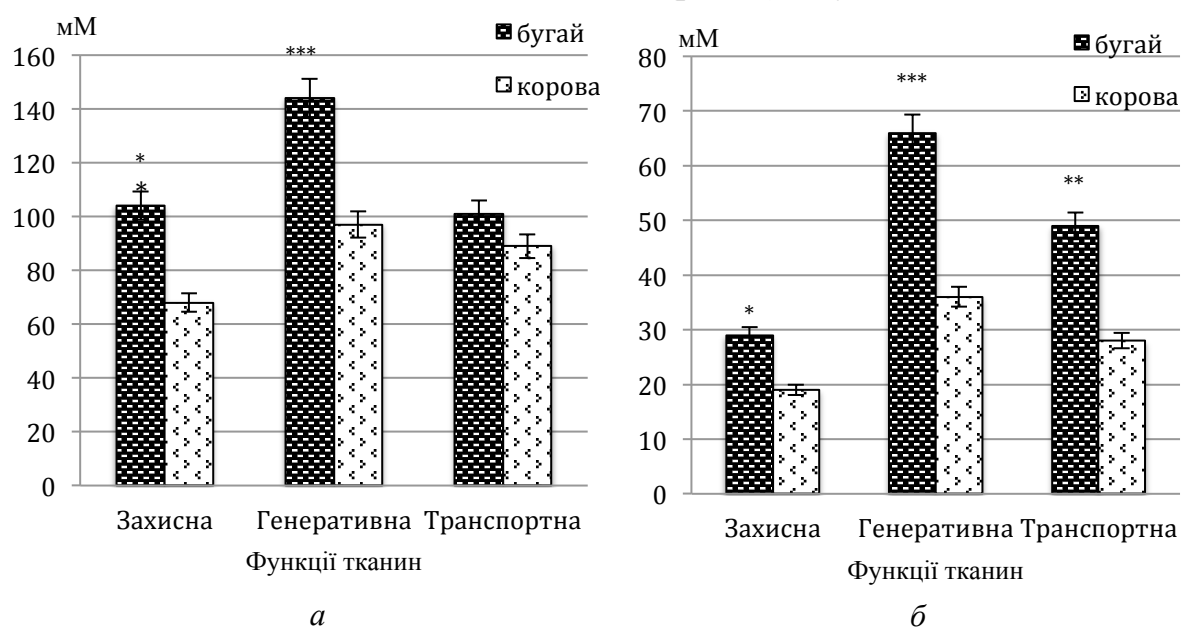


Рис. 9. Концентрація вільного Na^+ (а) та K^+ (б) у тканинах органів статевих систем бугая і корови, мМ (n = 10)

вільного Na^+ у ФВЕ тканин статевих органів бугаїв і корів вища, ніж K^+ . Їх характерною особливістю є зниження концентрації вільного Na^+ і K^+ у ФВЕ тканин дослідних груп. Концентрація іонів у тканинах, які виконують генеративну функцію, – найвища; у тканинах, які виконують транспортну функцію, – середня, а у тканинах, які виконують захисну функцію, – найнижча.

Ліміти концентрації іонів, визначені у ФВЕ тканин статевих органів бугаїв і корів, зумовлюють неоднакові показники співвідношень вільного $\text{Na}^+:\text{K}^+$ (рис. 10). Співвідношення концентрації вільного $\text{Na}^+:\text{K}^+$ у тканинах статевих органів бугаїв, які виконують генеративну функцію, на одну частину вмісту Na^+ менше, ніж у тканинах органів корів. Вказана особливість характерна також для тканин, функції яких формують умови для переміщення сперматозоїдів і яйцеклітин каналами та протоками статевих органів самців і самок. Середній показник співвідношення концентрації $\text{Na}^+:\text{K}^+$ у тканинах органів бугаїв, які виконують захисну функцію, на дві частини вмісту Na^+ (4:1) більший, ніж у тканинах органів, які виконують генеративну і транспортну функції (2:1).

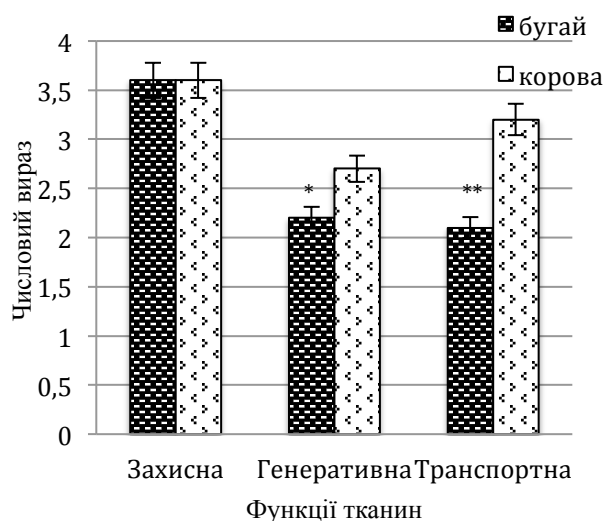


Рис. 10. Співвідношення концентрації вільного $\text{Na}^+:\text{K}^+$ у тканинах органів статевих систем бугая і корови, ч.в. (n = 10)

Співвідношення концентрації $\text{Na}^+:\text{K}^+$ у тканинах статевих губ і піхви корів також становить 4:1. Його числовий вираз у тканинах органів, які виконують генеративну і транспортну функції (3:1), лише на одну частину вмісту Na^+ більший, ніж K^+ . Це може означати, що виявлені у ФВЕ тканин статевих органів самців і самок параметри концентрації вільного Na^+ і K^+ та її співвідношення створюють умови, за яких відбуваються процеси сперматозоїдогенезу і плазмогенезу, здійснюється транспорт утворених секретів каналами й протоками органів, зберігається життєздатність сперматозоїдів, формується їх запліднювальна здатність.

Активність транспортних АТФаз

З метою визначення впливу ендогенних чинників на гомеостаз іонів лужних металів у системі "середовище – клітина" з'ясували його зв'язок з активністю

АТФаз у сперматозоїдах за нормального й патологічного сперматогенезу. Аналіз спермограм пацієнтів клініки свідчить, що у неплодних чоловіків показники концентрації (48 проти 81 млн/см³), кількості рухливих (30 проти 71 %) та живих (32 проти 64 %) сперматозоїдів нижчі, ніж у плідних, але об'єму еякуляту (3,9 проти 3,2 см³) та кількості патологічних форм сперматозоїдів (54 проти 18 %) – вищі (табл. 2).

Наведені зміни показників спермограми означають, що під час розвитку патологічних процесів придаткові залози утворюють більший об'єм спермальної плазми, показник рН якої зміщений у лужний бік (7,37 проти 7,68). За таких умов генеративні тканини утворюють у 1,7 разу меншу кількість сперматозоїдів, із яких 54 % мають змінену форму будови і тільки 32 % живих клітин.

Таблиця 2

Показники спермограм плідних і неплодних чоловіків (n = 180)

Чоловіки	Еякуляти			Сперматозоїди, %		
	об'єм, см ³	рН	концентрація, млн/см ³	рухливі	живі	патологічні
плідні	3,22±0,33	7,68±0,12	80,80±9,44	70,71±2,08	64,46±1,90	18,46±0,88
неплідні	3,90±0,58	7,37±1,10	47,90±1,65**	29,96±2,86***	31,96±2,71***	54,02±1,92**

На тлі цих змін виявлено, що показники концентрації Ca²⁺ (6,8 проти 6,4 мМ), K⁺ (20 проти 18 мМ), Na⁺ (88 проти 75 мМ) спермальної плазми неплодних чоловіків, при незначних відхиленнях у бік зниження, співпадаються з показниками плідних (табл. 3). Співвідношення концентрації різнойменних пар K⁺:Ca²⁺ (3:1) і Na⁺:K⁺ (4:1) у системі "спермальна плазма – сперматозоїди" – не змінюється, але Na⁺:Ca²⁺ (12:1 проти 13:1) у неплодних чоловіків на одну частину вмісту Na⁺ стає меншим.

Таблиця 3

Концентрація (мМ) та співвідношення іонів (числові вирази) у спермальній плазмі та сперматозоїдах плідних і неплодних чоловіків (n = 180)

Чоловіки	Об'єкт досліджень	Ca ²⁺	K ⁺	Na ⁺
плідні	спермальна плазма	6,84 ± 0,22	20,47 ± 0,21	88,00 ± 1,37
неплідні		6,38 ± 0,85	18,16 ± 1,12	75,36 ± 2,86
плідні	сперматозоїди	1,17 ± 0,05	3,34 ± 0,11	19,90 ± 0,57
неплідні		1,35 ± 0,26	3,12 ± 0,56	20,52 ± 0,38
		Na ⁺ :Ca ²⁺	K ⁺ :Ca ²⁺	Na ⁺ :K ⁺
плідні	спермальна плазма	13:1	3:1	4:1
неплідні		12:1	3:1	4:1
плідні	сперматозоїди	17:1	3:1	6:1
неплідні		15:1	2:1	7:1

Якщо зміни гомеостазу іонів лужних металів у спермальній плазмі еякулятів неплодних чоловіків, за винятком співвідношення концентрації Na⁺:Ca²⁺, незначні, то збільшення концентрації Na⁺ і Ca²⁺ у сперматозоїдах неплодних чоловіків

зменшує числовий вираз співвідношення $\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$ (15 проти 17:1) на дві, $\text{K}^+:\text{Ca}^{2+}$ (2 проти 3:1) – на одну, але $\text{Na}^+:\text{K}^+$ (7 проти 6:1) – на одну частину вмісту збільшує.

Визначена активність Na^+/K^+ -, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ - і Mg^{2+} -АТФаз свідчить, що у перфорованих мембранах сперматозоїдів плідних чоловіків вона в 1,5, 2,4 і 1,2 разу менша, ніж у неплідних (табл. 4).

Ці дані дають змогу припустити, що підвищена активність транспортних АТФаз за умов патоспермії може бути пов'язана з конформаційними змінами цитоплазматичної мембрани сперматозоїдів, унаслідок чого просторова конформація іонних pomp забезпечує максимальний доступ субстратів до активних центрів ферментів.

Таблиця 4

Активність транспортних АТФаз перфорованих мембран сперматозоїдів, мкмоль Φ_n /мг білка·хв (n = 60)

Чоловіки	Na^+/K^+ -АТФаза	$\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -АТФаза	Mg^{2+} -АТФаза
плідні	$3,1 \pm 0,25$	$1,9 \pm 0,34$	$4,6 \pm 0,28$
неплідні	$4,7 \pm 0,51^{**}$	$4,6 \pm 0,42^{***}$	$5,5 \pm 0,37^*$

Концентрація про- і протизапальних інтерлейкінів

Інтерлейкіни є регуляторними поліпептидами з різною імунологічною активністю. Їх продукують сперматогонії, клітини Сертолі та інтерстиціальні клітини тканин органів статевої системи самців. Зв'язуючись із рецепторами клітин-мішеней, вони стимулюють трансдукцію внутрішньоклітинних сигналів, регулюють ріст і розвиток зародкових клітин, репродуктивну, нейроендокринну та тестикулярну функції тканин статевих органів. До наведеного слід додати, що секреторні клітини тканин статевих органів не лише продукують інтерлейкіни, але й регулюють їх секрецію. Зниження інтенсивності утворення цих сполук призводить до стерильності сперматозоїдів і неплідності чоловіків (Douset K., 1997; Li Qian, 2012).

Тому ми з'ясовували роль параметрів концентрації про- (ІЛ-6, ІЛ-8) і протизапальних (ІЛ-10) інтерлейкінів у розвитку патологічних змін, які можуть бути причиною виникнення стерильності сперматозоїдів (табл. 5). Виявлені за нормального і патологічного стану статевих органів чоловіків відмінності між показниками їх спермограм підтверджують, що запальні процеси можуть інгібувати генеративну функцію тканин яєчок (показник концентрації, кількості рухливих і живих сперматозоїдів неплідних чоловіків у 1,4 – 1,5 разу менший, ніж плідних). Це знижує життєздатність сперматозоїдів, але стимулює генеративну функцію тканин придаткових залоз, які синтезують більшу кількість секрету спермальної плазми.

Проведений аналіз можливості існування корелятивного зв'язку між показниками концентрації про- і протизапальних інтерлейкінів у еякулятах плідних і неплідних чоловіків свідчить: лише щодо змін концентрації прозапального ІЛ-6 та протизапального ІЛ-10 може йтися про високу позитивну координацію процесів їх синтезу імунними й інтерстиціальними клітинами, клітинами Сертолі та сперматогоніями у тканинах органів статевої системи здорових чоловіків ($r_{\text{IL-10:6}} = 0,67$).

**Параметри концентрації інтерлейкінів
у спермальній плазмі чоловіків, пг/см³ (n = 60)**

Інтерлейкіни	Чоловіки				
	плідні	неплідні	Неплідні		
			I	II	III
IL-6	4,62±0,56	30,58±4,78 ^{***}	6,22±0,83	19,64±1,27	74,06±6,81
lim	3 – 6	1 – 98	6 – 25	20 – 33	42 – 94
r _{IL-6:8}	0,40	0,00	0,54	-0,12	0,47
IL-8	973,92±66,10	1684,45±118,78 [*]	1084,36±37,49	1987,55±99,10	2762,53±49,67
lim	859 – 1206	736 – 3033	1080 – 1540	1490 – 1990	1950 – 2760
r _{IL-8:10}	-0,18	0,24	0,10	0,12	0,27
IL-10	14,60±1,51	10,53±1,26 [*]	4,06±0,27	9,28±0,77	23,53±1,76
lim	11 – 20	0,4 – 31	4 – 8	9 – 11	12 – 24
r _{IL-10:6}	0,67	0,14	-0,51	0,15	0,72

Ймовірно, вказаний стан взаємозв'язку зумовлений дуже широкими лімітами мінімальних і максимальних значень показників концентрації IL-8 (859 – 1206) у здорових та IL-6 (1 – 98), IL-8 (736 – 3033) і IL-10 (0,4 – 31 пкг/см³) у неплодних чоловіків.

З метою більш детального аналізу отриману вибірку параметрів концентрації інтерлейкінів поділили на три групи. Середні значення концентрації IL-6 у групах I, II і III становили 6,2, 19,6 і 74,0; IL-8 – 1084,4, 1987,5, 2762,5 та IL-10 – 4,1, 9,3 і 23,5 пкг/см³ відповідно. Проведений кореляційний аналіз щодо зв'язку їх концентрацій між групами свідчить: за високих значень IL-6, IL-8 і IL-10 між IL-6 і IL-8 (r_{IL-6:8} = 0,47) існує середній, а між IL-10 і IL-6 – тісний (r_{IL-10:6} = 0,72) позитивний корелятивний зв'язок. В усіх інших випадках показник зв'язку їх концентрацій малий.

Отже, підвищений рівень IL-6 і IL-8 супроводжується зниженням якості сперми, а можливо, і неплодністю, а IL-10 відіграє важливу роль у поліпшенні параметрів спермограми.

Реакція системи "середовище – клітина" на дію екзогенних чинників

Функціональний стан клітин залежить від градієнта концентрації іонів неорганічних і органічних сполук у системі "середовище – клітина". Різниця концентрації іонів і молекул ініціює адаптивну реакцію клітин, корегує процес акумуляції енергії, забезпечує постачання поживних речовин у клітини, тканини, органи. Однак наведені ознаки біофізичних і біохімічних процесів недостатньо характеризують стан життєво важливих функцій сперматозоїдів. Тому відомі сьогодні базові моделі (Линник Т. П., Мартынюк И. Н., 2010), які пояснюють механізм впливу кріопротекторів і розріджувачів сперми на функціональну повноцінність клітин, потрібно доповнити дослідженням особливостей змін концентрації Ca²⁺, K⁺, Na⁺, а також співвідношень їх одно- (Na⁺:Na⁺, K⁺:K⁺,

$\text{Ca}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$) та різнойменних ($\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$, $\text{K}^+:\text{Ca}^{2+}$, $\text{Na}^+:\text{K}^+$) пар у свіжоотриманій нативній, розрідженій, еквіліброваній і деконсервованій спермі.

Абсолютні зміни. Впроваджені в роботу кріобіологічних і біотехнологічних лабораторій вимоги до ТКС необлицьованими гранулами та визначені й апробовані нами параметри оптимальної концентрації складових моно- і полікомпонентних ЗС (дослід (ЗС_д), контроль (ЗС_к)) зумовлюють різні способи (симпорт, антипорт) переміщення іонів у системі "середовище – клітина". Вони також спричиняють появу певних кількісних змін концентрації та співвідношень Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у сперматозоїдах (табл. 6).

Наслідком змін, що відбуваються за дії чинників етапу еквілібрації нативної сперми (НС), є зниження концентрації іонів у клітинах. Якщо розморожувати гранули нативної сперми, то Ca^{2+} (1,5 – 2 мМ), K^+ (9 – 10 мМ), Na^+ (16 – 22 мМ) симпортним способом переміщуються з середовища у сперматозоїди. Якщо ж гранули розморожувати в натрію цитраті (НЦ), то в системі "середовище – сперматозоїди" відбувається антипортний рух Na^+ у клітини щодо Ca^{2+} і K^+ з них. Таким чином, переміщений у клітини Na^+ витісняє з них Ca^{2+} і K^+ , концентрація яких знижується з 1,5 до 0,7 та з 9 до 3 мМ відповідно.

Таблиця 6

Абсолютні зміни концентрації іонів у сперматозоїдах бугаїв за дії чинників моно- і полікомпонентних захисних середовищ, мМ (n = 25)

Чинник впливу	Сперма та етапи ТКС			
	свіжоотримана	розрідження	еквілібрація	деконсервація
Ca^{2+}				
НС	1,6	1,6	1,5	2,1
НЦ	1,6	1,6	1,5	0,7
ВРК	1,7	1,1	1,0	0,5
ЗС _к	1,9	2,3*	2,2*	1,0
ЗС _д	1,9	2,1	2,0	0,9
K^+				
НС	8,9	8,9	8,8	9,6
НЦ	8,9	8,9	8,8	3,5
ВРК	8,2	5,1**	4,6**	2,1***
ЗС _к	6,9*	5,4**	5,3**	2,1***
ЗС _д	6,8	5,3**	5,2**	1,5***
Na^+				
НС	16,3	16,3	15,9	22,3
НЦ	16,3	16,3	15,9	30,9***
ВРК	17,6	10,2**	9,7**	37,8***
ЗС _к	22,5**	14,8*	14,5	36,7***
ЗС _д	21,8**	14,7*	14,5	36,1***

Примітка. НС – нерозріджена сперма, НЦ – натрію цитрат, ВРК – водні розчини кріопротекторів, ЗС_к – контрольне середовище, ЗС_д – дослідне середовище.

На етапах розрідження й еквілібрації сперми водними розчинами кріопротекторів (ВРК) оптимальної концентрації відбувається симпортний вихід Ca^{2+} , K^+ , Na^+ зі сперматозоїдів у середовище. Концентрація Ca^{2+} у клітинах знижується з 2 до 1, K^+ – із 8 до 5, Na^+ – із 18 до 10 мМ. Після деконсервації гранул у розчині НЦ клітина втрачає 70 – 85 % початкового вмісту K^+ і Ca^{2+} . За цих умов антипортний спосіб переміщення іонів змінює концентрацію Na^+ з 18 до 38, Ca^{2+} – з 1,7 до 0,5, K^+ – з 8 до 2 мМ. Отже, підвищення концентрації Na^+ в сперматозоїдах у 2 рази щодо рівня еквіліброваної сперми знижує концентрацію Ca^{2+} і K^+ в 3 і 4 рази щодо її початкового рівня в клітинах свіжоотриманої сперми.

Зміни концентрації іонів на етапах кріоконсервації сперми, розрідженої полікомпонентним 3C_k , інші, ніж розрідженої монокомпонентними ВРК. Після дії чинників етапу розрідження концентрація Ca^{2+} у клітинах стає більшою на 0,4, а K^+ і Na^+ – меншою на 1,5 і 8 мМ. Отже, на цьому етапі ТКС відбувається антипортний рух Ca^{2+} у клітини щодо K^+ і Na^+ з них.

Встановлена на етапі розрідження рівновага концентрації іонів після еквілібрації сперми не зазнає суттєвих змін. Але після деконсервації гранул концентрація Ca^{2+} у сперматозоїдах знижується з 2 до 1, K^+ – з 5 до 2 мМ, що вдвічі-втричі менше, ніж у сперматозоїдах еквіліброваної сперми. Переміщений зі середовища у сперматозоїди Na^+ (39 %) витісняє з клітин K^+ (39 %) і Ca^{2+} (47 %).

Виявлений у 3C_k антипортний спосіб переміщення іонів ідентичний до того, що є в 3C_d . Вища в 2,5 рази концентрація Na^+ (14 – 36 мМ) знижує в сперматозоїдах деконсервованих гранул концентрацію Ca^{2+} (2 – 0,9 мМ) у 2,3, K^+ (5 – 1,5 мМ) – у 3,4 рази. Результати аналізу абсолютних і відносних показників змін вмісту іонів у сперматозоїдах свідчать про те, що сумарний вплив оптимальних рівнів концентрації складових 3C_d на інтенсивність обміну K^+ у системі "середовище – клітина" вищий, ніж у 3C_k . За цих умов зміни концентрації Ca^{2+} менші, ніж Na^+ , а Na^+ – менші, ніж K^+ ($\text{Ca}^{2+} < \text{Na}^+ < \text{K}^+$).

Визначені зміни концентрації іонів свідчать, що чинники етапу еквілібрації несуттєво змінюють сформований генеративними тканинами статевих органів бугая її початковий рівень у сперматозоїдах. Зміни параметрів концентрації Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у клітинах не виходять за межі 0,1 – 0,4 мМ. Однак їх реакція на дію чинників етапу деконсервації гранул нативної сперми й у розчині НЦ – різна.

Деконсервація нативної сперми призводить до того, що абсолютні параметри концентрації Ca^{2+} , K^+ , Na^+ сперматозоїдів деконсервованих гранул на 0,5, 0,8 і 6 мМ відповідно більші, ніж за дії чинників етапу еквілібрації. Після деконсервації гранул у розчині НЦ цей показник для Ca^{2+} і K^+ менший на 0,8 і 5, а для Na^+ – більший на 15 мМ. Визначені зміни свідчать про те, що незахищені кріопротекторами сперматозоїди по-різному реагують на дію чинників етапу деконсервації гранул. Якщо проводити деконсервацію нативної сперми, то відбувається симпортний рух Ca^{2+} , K^+ , Na^+ із середовища у сперматозоїди. Однак, якщо гранули НС розморожувати у розчині НЦ, то Na^+ прямує у клітини. Переміщений у сперматозоїди вміст Na^+ та сформована дія іонної сили складових середовища витісняє Ca^{2+} і K^+ із клітин.

Визначені після розрідження сперми монокомпонентними ВРК абсолютні зміни концентрації Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у сперматозоїдах (0,6, 3, 7 мМ) відповідно у 6, 6, 14

разів більші, ніж після еквілібрації (0,1, 0,5, 0,5 мМ). Після деконсервації гранул абсолютні зміни концентрації Ca^{2+} і K^+ в 1,2 разу менші, ніж після розрідження, Na^+ – в 3,8 разу більші. За весь процес ТКС концентрація Ca^{2+} і K^+ знижується вдвічі, Na^+ – утричі.

Параметри абсолютних змін концентрації Ca^{2+} у сперматозоїдах після розрідження сперми $\text{ЗС}_к$ стають на 0,4 – 0,2 мМ більшими, ніж після її розрідження $\text{ЗС}_д$, але концентрація K^+ і Na^+ – відповідно на 2 і 8 – 7 мМ меншою. Чотиригодинне інкубування розрідженої сперми за 37 °С знижує рівень концентрації Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у клітинах. Визначений ліміт змін її параметрів становить 0,1 – 0,3 мМ. Однак, якщо після деконсервації гранул у розчині НЦ концентрація Ca^{2+} знижується на 1,2 – 1,1, а K^+ – на 3 – 4, то Na^+ – підвищується на 22 мМ. Отже, зміни, що відбуваються в системі "середовище – клітина" після розрідження сперми $\text{ЗС}_к$, в 3, 12 і 23 рази більші, ніж після її еквілібрації. Наведену особливість відображає ряд змін, у якому концентрація $\text{Ca}^{2+} < \text{K}^+ < \text{Na}^+$. Після деконсервації гранул концентрація цих іонів у сперматозоїдах стає в 7, 27 і 67 разів більшою. Тобто дія чинників етапу деконсервації гранул на гомеостаз іонів у клітинах удвічі-утричі вища за дію чинників етапів розрідження й еквілібрації сперми.

Визначені після розрідження сперми $\text{ЗС}_д$ абсолютні параметри концентрації іонів характеризує наведений вище ряд змін, у якому концентрація $\text{Ca}^{2+} < \text{K}^+ < \text{Na}^+$. Це означає, що зміни співвідношень концентрації вирівнюють порушену рівновагу вмісту іонів у системі "середовище – сперматозоїди", а результат цих змін ініціює перебіг адаптації клітин до дії нових умов середовища.

"Реакція – відповідь" сперматозоїдів на дію чинників $\text{ЗС}_к$ і $\text{ЗС}_д$ різна. Після еквілібрації сперми розрідженої, $\text{ЗС}_д$ і $\text{ЗС}_к$, концентрація Ca^{2+} і Na^+ у клітинах у 3 і 2, 23 і 28 разів відповідно більша, K^+ – в 12 і 10 разів менша, ніж у свіжоотриманій спермі. Зміни концентрації Ca^{2+} , що відбуваються після деконсервації гранул, у 7 і 10 разів більші, ніж після еквілібрації, K^+ – майже однакові (27 і 26 разів), Na^+ – у 67 і 86 разів більші.

Вектор змін абсолютних параметрів концентрації Ca^{2+} і Na^+ після деконсервації гранул сперми, розрідженої $\text{ЗС}_д$, спрямований у бік збільшення, а K^+ у спермі, яку розріджували $\text{ЗС}_к$, – у бік зменшення. Звідси випливає, що рекомендована нами зміна параметрів оптимальної концентрації криопротекторів і додаткове введення до складу $\text{ЗС}_д$ розчину гепарину на етапі розрідження сперми гальмує інтенсивність перебігу процесів трансмембранного обміну Ca^{2+} та K^+ і стимулює – Na^+ . Після деконсервації гранул замороженої сперми в $\text{ЗС}_д$ активується транспорт Ca^{2+} і Na^+ , але K^+ – інгібується.

Відносні зміни. Якщо незахищену криопротекторами сперму 4 год витримувати за 37 °С, то у спермальну плазму симпортним способом із клітин переміщується 1 – 4 % вмісту Ca^{2+} , K^+ , Na^+ (табл. 7).

У нативній спермі симпортний рух іонів спрямований зі спермальної плазми у сперматозоїди. Відносні зміни характеризує ряд, у якому параметри переміщеного вмісту $\text{K}^+ < \text{Ca}^{2+} \leq \text{Na}^+$, що становить 9, 37, 40 % відповідно. Якщо деконсервацію гранул НС проводити у розчині НЦ, то реакція сперматозоїдів на вплив температури і концентрації розчину – інша. Надлишок Na^+ із розчину антипортним способом

переміщується в клітини (95 %) і витісняє з них 51 % вмісту Ca^{2+} і 61 % – K^+ . Отже, вектор їх руху в системі "середовище – клітина" має різну спрямованість: (–) із клітин у середовище; (+) із середовища у клітину. Відсоток переміщеного вмісту $\text{Ca}^{2+} < \text{K}^+ < \text{Na}^+$.

Таблиця 7

Відносні показники вмісту іонів у сперматозоїдах бугаїв за дії моно- і полікомпонентних захисних середовищ, % (n = 25)

Чинник впливу	Сперма та етапи ТКС			
	розрідження	еквілібрація	деконсервація	дія усіх етапів
Ca^{2+}				
НС	0	–4	+37	+31
ЦН	0	–4	–51	–53
ВРК	–33	–12	–48	–69
ЗС _к	+22	–7	–53	–47
ЗС _д	+11	–5	–56	–54
K^+				
НС	0	–1	+9	+7
ЦН	0	–1	–61	–61
ВРК	–38	–9	–55	–75
ЗС _к	–21	–2	–61	–70
ЗС _д	–21	–3	–71	–78
Na^+				
НС	0	–2,5	+40	+37
ЦН	0	–2,5	+95	+90
ВРК	–42	–5	+288	+115
ЗС _к	–34	–2	+154	+63
ЗС _д	–32	–2	+149	+66

Дія монокомпонентних ВРК на трансмембранний спосіб переміщення іонів після розрідження сперми виражена симпортним рухом Ca^{2+} , K^+ , Na^+ із сперматозоїдів у середовище. Відносні зміни переміщеного вмісту становлять відповідно 33, 38, 42 %. Зміни, що відбуваються в системі "середовище – сперматозоїди", можна виразити рядом, у якому частина переміщеного вмісту $\text{Ca}^{2+} < \text{K}^+ \leq \text{Na}^+$.

На етапі еквілібрації розрідженої сперми інтенсивність руху іонів знижується в 3, 4, 8 разів. Зміни характеризує ряд, у якому частина переміщеного вмісту $\text{Ca}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Na}^+$ (12, 9, 5 %). Після деконсервації гранул у розчині НЦ 288 % переміщеного вмісту Na^+ витісняє з клітин 55 % K^+ і 48 % Ca^{2+} . Щодо етапу еквілібрації зміни вмісту іонів у сперматозоїдах є суттєвими, а саме: Na^+ – у 58, K^+ – у 6, Ca^{2+} – у 4 рази. Особливості змін виражено рядом, у якому частина переміщеного вмісту $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Ca}^{2+}$.

Після розрідження сперми дія чинників полікомпонентних ЗС_к і ЗС_д на трансмембранний рух іонів виражена антипортним рухом у клітини різного вмісту Ca^{2+} (22 і 11 %) щодо руху K^+ (21 %) і Na^+ (34 і 32 %) із клітин. Слід зазначити, що частина переміщеного вмісту K^+ у контрольному та дослідному ЗС однакова, Na^+ – практично однакова, тоді як зміни вмісту Ca^{2+} у ЗС_к удвічі більші, ніж у ЗС_д.

За 4 год еквілібрації розрідженої сперми зі сперматозоїдів у оточуюче їх середовище симпортним способом переміщується лише 2 – 3 % вмісту K^+ та Na^+ і 5 – 19 % Ca^{2+} . Унаслідок деконсервації гранул замороженої сперми у ЗС_к і ЗС_д з розчину НЦ у сперматозоїди переміщується 154 – 149 % вмісту Na^+ , який витісняє із деконсервованих клітин 53 – 56 % Ca^{2+} і 61 – 71 % K^+ .

Унаслідок дії чинників усіх етапів ТКС переміщених у сперматозоїди вміст Na^+ (63 – 66 %) витісняє з клітин 47 – 54 % вмісту Ca^{2+} і 70 – 78 % K^+ . Найбільші зміни вмісту іонів у сперматозоїдах характерні для K^+ . Для Na^+ вони на 10 – 20 % менші, ніж K^+ , а для Ca^{2+} – на 10 – 20 % менші, ніж Na^+ . Отже, за впроваджених вимог до ТКС необлицьованими гранулами гомеостаз іонів лужних металів у системі "середовище – клітина" зазнає змін, які негативно впливають на життєздатність сперматозоїдів деконсервованих спермодоз.

Узагальнюючи результати досліджень змін гомеостазу іонів у відкритих системах "середовище – клітина", слід зазначити, що адаптивна реакція сперматозоїдів НС та розрідженої ВРК і ЗС на дію чинників етапів ТКС різна. Розрідження сперми монокомпонентними ВРК спричинює симпортний рух Ca^{2+} , K^+ , Na^+ з клітин; полікомпонентними ЗС – антипортний рух Ca^{2+} у клітини щодо K^+ і Na^+ . Після дії чинників етапу еквілібрації нерозрідженої та розрідженої ВРК і ЗС сперми в системі "середовище – клітина" відбувається симпортне переміщення Ca^{2+} , K^+ , Na^+ із клітин у середовище. Деконсервація заморожених гранул НС призводить до симпортного руху Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у клітини, деконсервація гранул НС та розрідженої ВРК і ЗС у розчині НЦ – до антипортного руху Na^+ у клітини щодо переміщення K^+ і Ca^{2+} в оточуюче сперматозоїди середовище.

Дія чинників ТКС на сперматозоїди виражена різними абсолютними (мМ) показниками змін концентрації іонів. У сперматозоїдах НС після дії чинників етапу еквілібрації вірогідних змін не виявлено. За деконсервації гранул НС зміни концентрації іонів більші, ніж у кріозахисних розчинах. Після розрідження сперми ВРК концентрація Ca^{2+} і K^+ у клітинах стає меншою; Na^+ після розрідження й еквілібрації – знижується, але після деконсервації – зростає. Концентрація Ca^{2+} стає вищою після дії чинників етапу розрідження сперми, Na^+ – вищою після деконсервації гранул, K^+ – знижується за дії чинників усіх етапів ТКС, Ca^{2+} – знижується після еквілібрації та деконсервації, а Na^+ – після розрідження й еквілібрації.

Відносні зміни вмісту іонів у сперматозоїдах диференційовані щодо дії чинників усіх етапів ТКС, а саме: після етапу еквілібрації НС дисбаланс вмісту іонів несуттєвий (1 – 4 %), після деконсервації – в 9 – 10 разів більший. Після деконсервації гранул нативної сперми зафіксовано зміни вмісту $K^+ < Ca^{2+} \leq Na^+$, у розчині – $Ca^{2+} < K^+ < Na^+$. Якщо після розрідження сперми монокомпонентними ВРК зміни становлять 30 – 40, еквілібрації – 5 – 12, деконсервації – 50 – 300 %, то після розрідження полікомпонентними ЗС – 10 – 30, 2 – 19, 50 – 150 %, що відповідно в 1 – 3 рази менше. За дії усіх чинників виявлені зміни вмісту $Ca^{2+} < K^+ < Na^+$. Слід зазначити, що в обмінних процесах брало участь 50 – 80 % первинного вмісту іонів у сперматозоїдах НС. Інтенсивність процесів обміну виражає ряд, у якому відсоток переміщеного вмісту $Ca^{2+} < Na^+ < K^+$.

Результатом обмінних процесів за дії чинників етапів ТКС є суттєва зміна гомеостазу різнойменних пар іонів у сперматозоїдах та між середовищем і сперматозоїдами. Ліміт співвідношень їх вмісту у клітинах становить: $K^+ : Ca^{2+} - 2 - 6 : 1$, $Na^+ : K^+ - 2 - 24 : 1$, $Na^+ : Ca^{2+} - 6 - 73 : 1$. Однак між середовищем і сперматозоїдами – ці ліміти такі: $7 - 53 : 1$, $6 - 38 : 1$, $28 - 100 : 1$, що в 3 – 4 рази більше. Середні показники співвідношень концентрації однойменних пар характеризує ряд, у якому $Na^+ : Na^+ < Ca^{2+} : Ca^{2+} < K^+ : K^+$.

Таким чином, наведений аналіз впливу екзогенних чинників на сперматозоїди свідчить, що визначені параметри змін гомеостазу іонів лужних металів (абсолютні та відносні зміни), симпортний і/або антипортний способи переміщення іонів (адаптивна реакція сперматозоїдів на дію чинників ТКС, монокомпонентних ВРК і полікомпонентних ЗС), можна успішно використовувати для корекції стану динамічної рівноваги іонів неорганічних і молекул органічних сполук у системі "середовище – клітина".

Зміни структури і функцій сперматозоїдів

Проведений електронно-мікроскопічний аналіз змін будови сперматозоїдів бугаїв показав, що близько 16 % клітин мають змінену структуру акросоми й цитоплазматичної мембрани, їх рухливість у свіжоотриманих еякулятах високої якості становила 8 балів, а кількість живих клітин – 67 % (табл. 8).

Таблиця 8

Дія чинників технології кріоконсервації сперми бугаїв на функції та стан структури незахищених сперматозоїдів, $M \pm m$ (n = 34)

Показники	Сперма		
	нерозріджена	еквілібрована	деконсервована
деструкція мембран, %	16,05 ± 2,48	70,91 ± 3,29**	91,11 ± 0,90***
рухливість сперматозоїдів, бал	8,52 ± 0,19	3,63 ± 0,34**	0,00
кількість живих клітин, %	67,39 ± 0,76	22,75 ± 4,01**	M

Примітка: M – мертві сперматозоїди.

За дії чинників етапу еквілібрації сперми кількість деструктивно змінених клітин зростає до 71 %, і лише 23 % сперматозоїдів зберігають здатність до поступального прямолінійного руху. Після дії чинників етапу деконсервації сперми усі клітини втрачають життєздатність. Водночас 9 % із них не зазнають видимих деструктивних змін.

Якщо негативний вплив чинників ТКС на сперматозоїди зменшити за допомогою захисного лактозо-жовтково-гліцеринового розріджувача сперми, то кількість деструктивно змінених клітин у еквіліброваній спермі зростає до 27 %, а після деконсервації гранул – до 57 % (табл. 9).

Доведено, що під час активного репродуктивного періоду плідники можуть виділяти еякуляти, у яких параметри життєздатності сперматозоїдів низькі. Ще не розріджену сперму низької якості спеціалісти вибраковують одразу, не допускаючи

її до ТКС. Після визначення у деконсервованих гранулах показників низької рухливості сперматозоїдів спермодози вибраковують ще раз. Показник рухливості сперматозоїдів у гранулах, які допускають до осіменіння, має бути не меншим ніж 3 бали. Тому дослідження наступного етапу роботи спрямували на виявлення можливих причин появи еякулятів низької та високої якості у плідників під час їх активного статевого навантаження.

Таблиця 9

**Дія чинників технології кріоконсервації
сперми бугаїв на стан структури захищених сперматозоїдів, % (n = 34)**

Сперма	Сперматозоїди			
	типові	нетипові		
		патологічні	юні	деструктивні
свіжоотримана	80	7	3	10
розріджена	76*	7	3	14*
еквілібрована	63**	7	3	27**
деконсервована	36**	7	—	57**

Зміни функціонального стану сперматозоїдів плідників, які виділяють еякуляти з низькою, середньою та високою концентрацією K^+ , аналізували три роки. Оцінювали три групи бугаїв, по три плідники у кожній. У групі НКК оцінили функціональний стан сперматозоїдів у 523, у СКК – 568, у ВКК – 522 нативних та в 425, 510, 396 деконсервованих еякулятах відповідно (рис. 11).

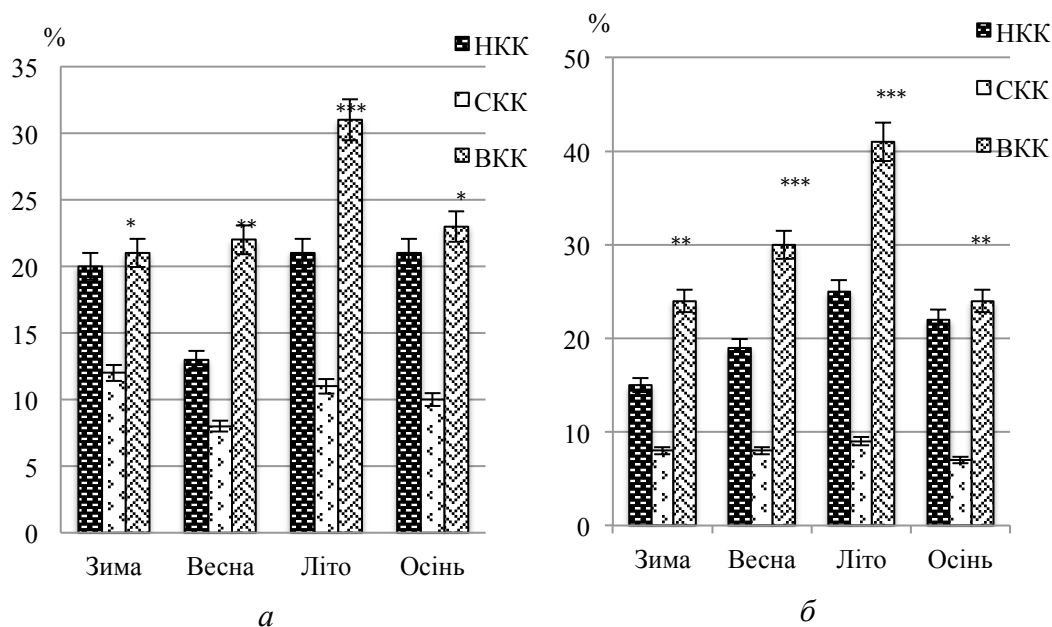


Рис. 11. Кількість вибракуваних нативних (а) еякулятів бугаїв та деконсервованих (б) спермодоз у різні пори року (%)

Результати аналізу якості нативної та деконсервованої сперми свідчать, що за три роки найменшу кількість (n = 57 або 10 %) нативних нерозріджених еякулятів вибракували весною у групі СКК. Ліміт їх вибракуваної кількості у групах НКК і

ВКК становив 13 – 21 і 21 – 31 % від 523 і 522 отриманих. Після оцінювання рухливості сперматозоїдів у деконсервованій спермі виявлено неоднакову реакцію сперматозоїдів дослідних груп НКК, СКК, ВКК на умови заморожування сперми до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ та деконсервації гранул у 2,8% розчині НЦ за $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

За три роки на племпідприємстві із числа отриманих вибракувано в середньому 35, 17 і 47 % еякулятів, рухливість сперматозоїдів у яких не відповідала параметрам встановленої норми.

Мінімізація шкочочинного впливу захисних середовищ

Рекомендовані способи оцінювання змін, що відбуваються у відкритих системах типу "середовище – клітина", мають два аспекти. Прийоми першого визначають ступінь прямої дії чинників ТКС, другого – опосередковані (відносні) зміни стану структури та функцій сперматозоїдів. Визначені параметри змін дають змогу оптимізувати дисбаланс вмісту іонів лужних металів у системі "середовище – сперматозоїди" за дії фізичних і хімічних чинників ЗС і ТКС.

За мінімізації лімітів відхилень концентрації Ca^{2+} (1,6 – 1,9), K^{+} (7 – 9), Na^{+} (16 – 22 мМ) у сперматозоїдах визначене після розрідження сперми полікомпонентним ЗС_д співвідношення концентрацій $\text{Na}^{+}:\text{Ca}^{2+}$ і $\text{K}^{+}:\text{Ca}^{2+}$ стає меншим у 1,6 і 1,3, а після розрідження ЗС_к – удвічі. Водночас у першому й другому випадках показник співвідношень концентрації $\text{Na}^{+}:\text{K}^{+}$ однаковий і становить 2 – 3:1. Зміни гомеостазу іонів виражено антипортним рухом Ca^{2+} щодо K^{+} і Na^{+} . Кількість переміщеного у сперматозоїди вмісту Ca^{2+} збільшується на 11 – 23 %; K^{+} і Na^{+} – на 21 – 22 і 32 – 34 % відповідно зменшується ($P < 0,05$).

Після дії чинників етапу еквилібрації "реакція – відповідь" сперматозоїдів на дію полікомпонентних ЗС однакова. Концентрація Ca^{2+} , K^{+} , Na^{+} у клітинах зменшується на 0,1 – 0,5 мМ. Відносні зміни вмісту $\text{Ca}^{2+} > \text{K}^{+} > \text{Na}^{+}$. Їх ліміти становлять 4 – 12, 1 – 9, 2 – 4 % відповідно. Іони симпортним способом переміщуються із клітин у середовище. Визначений у ЗС_д показник переміщеного з клітин їх вмісту становить 2 – 5, у ЗС_к – 2 – 7 % ($P > 0,05$).

За дії чинників етапу деконсервації гранул розрідженої сперми ЗС_д і ЗС_к концентрація Ca^{2+} у сперматозоїдах зменшується на 1, K^{+} – на 4 – 3 мМ, Na^{+} – збільшується на 22 мМ. Це означає, що антипортний спосіб переміщення Na^{+} з середовища у сперматозоїди витісняє з клітин Ca^{2+} і K^{+} . Ліміт переміщеної кількості Na^{+} становить 149 – 154, K^{+} – 61 – 71, Ca^{2+} – 56 – 53 %. Тобто зміни вмісту $\text{Na}^{+} > \text{K}^{+} > \text{Ca}^{2+}$. За дії чинників усіх етапів ТКС у переміщенні іонів із клітин у середовище бере участь 5 – 8 % вмісту Ca^{2+} , 8 – 18 % K^{+} ($P > 0,05$), із середовища у сперматозоїди – 134 – 139 % Na^{+} ($P < 0,001$). Якщо взяти до уваги, що після деконсервації гранул сперми розрідженої монокомпонентними ВРК сперматозоїди не виживають, то дію 2,8% розчину НЦ на етапі деконсервації гранул розрідженої сперми полікомпонентними ЗС_д і ЗС_к можна розглядати як таку, що ініціює вихід сперматозоїдів зі стану анабіозу.

Негативний вплив чинників ТКС на структуру та функції сперматозоїдів мінімізує середовище, що містить 6% глюкози, 9% лактози, 3% альбуміну, 3%

диметилсульфоксиду, 3% гліцерину, 300 од. дії (або $6 \text{ см}^3/100 \text{ см}^3 \text{ ЗС}$) гепарину, 15% жовтка курячого яйця. Його захисна дія оптимізує баланс вмісту Na^+ , підвищує життєздатність і запліднювальну здатність деконсервованих сперматозоїдів.

ВИСНОВКИ

Наведені у дисертаційній роботі результати досліджень є науковою базою для поглибленого розуміння особливостей трансмембранних змін гомеостазу іонів неорганічних та молекул органічних сполук у відкритих і закритих системах "середовище – клітина". Вони розкривають особливості механізму захисної дії кріопротекторів на сперматозоїди. Розроблені способи оцінювання та методологію досліджень особливостей змін структури й функцій ізольованих клітин рекомендується використовувати для створення ефекторів нового покоління, регуляторів функціональної активності іонтранспортних систем у сперматозоїдах.

1. На стадіях становлення, стабілізації й згасання репродуктивної функції генеративні тканини статевих органів бугаїв виділяють еякуляти, спермальна плазма і сперматозоїди яких містять індивідуально постійні ліміти низької (12 – 17 і 5 – 7), середньої (26 – 31 і 10 – 12) і високої (45 – 52 і 15 – 17 мМ) концентрації K^+ .

2. Індивідуальна постійність рівнів концентрації іонів спермальної плазми та сперматозоїдів пов'язана з гіпо- і гіперфункціями тканин генеративних органів (яєчко, придаткові залози) статевої системи плідників. Визначений дисбаланс співвідношень концентрації різнойменних пар іонів ($\text{Na}^+:\text{K}^+$, $\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$, $\text{K}^+:\text{Ca}^{2+}$) у спермальній плазмі становить $\pm 2 - 13$, у сперматозоїдах – $\pm 1 - 8$, між спермальною плазмою і сперматозоїдами – $\pm 6 - 47$ частин їх вмісту, але однойменних ($\text{Ca}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$, $\text{K}^+:\text{K}^+$, $\text{Na}^+:\text{Na}^+$) між спермальною плазмою і сперматозоїдами – $\pm 0 - 2$.

3. Бар'єрна, буферна, компенсаторна роль різних параметрів концентрації вільних і зв'язаних Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , яка забезпечує відповідний рівень гомеостазу іонів у системі "середовище – клітина", спрямована на координацію захисної, трофічної, генеративної, транспортної функцій тканин репродуктивних органів самців (бугай) і самок (корова), зумовлює пасивне і/або активне переміщення сперматозоїдів у їх каналах і протоках.

4. Різні ліміти концентрації та співвідношень різно- ($\text{Na}^+:\text{K}^+$, $\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$, $\text{K}^+:\text{Ca}^{2+}$) і однойменних ($\text{Ca}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$, $\text{K}^+:\text{K}^+$, $\text{Na}^+:\text{Na}^+$) пар іонів лужних металів закритих систем "середовище – клітина" вказують на їх зв'язок із процесами, що забезпечують сперматозоїдогенез і плазмогенез тканин статевих органів.

5. Наявність у еякулятах із низькою та високою концентрацією K^+ відповідно високої (27,6 – 13,2 мг%) і низької (20,4 – 8,6 мг%) концентрації лінолевої та ліноленової кислот свідчить про її зв'язок зі стійкістю акросоми та цитоплазматичної мембрани сперматозоїдів до негативної дії умов технології кріоконсервації сперми.

6. Підвищена активність транспортних АТФаз перфорованих мембран сперматозоїдів пов'язана з удвічі меншими від норми показниками їх концентрації та рухливості, втричі більшою кількістю клітин аномальної форми. За норми і

патології статевих органів числовий вираз співвідношень концентрації однойменних пар $K^+:K^+$ (6:1) та $Na^+:Na^+$ (4:1) не зазнає змін.

7. Спермальна плазма неплодних чоловіків містить у 6,6 і 1,7 разу вищу концентрацію прозапальних інтелейкінів IL-6 (30,6 проти 4,6 пг/см³) та IL-8 (1684 проти 974 пг/см³), але протизапального IL-10 (10,5 проти 14,6 пг/см³) – в 1,4 разу меншу, ніж у плідних. Різниця концентрації інтерлейкінів, можливо, зумовлена запальними процесами, які відбуваються у тканинах статевих органів.

8. Адаптивна реакція сперматозоїдів нативної сперми на дію умов першого етапу технології кріоконсервації сперми різна. Її розрідження монокомпонентними водними розчинами (гепарин 300 од. дії, 15% емульсія жовтка, 9% лактоза і 3% гліцерин) є причиною симпортного руху Ca^{2+} , K^+ , Na^+ із клітин; полікомпонентними захисними середовищами (лактозо-жовтково-гліцериновим та лактозо-жовтково-гліцерино-гепариновим) – антипортного руху Ca^{2+} у клітини щодо переміщення K^+ і Na^+ в оточуюче сперматозоїди середовище.

9. Після розрідження сперми монокомпонентними водними розчинами зміни вмісту Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у сперматозоїдах становлять 30 – 40 %, після еквілібрації – 5 – 12 %, деконсервації – 50 – 300 %, а розрідження полікомпонентними захисними середовищами – 10 – 30, 2 – 19, 50 – 150 % відповідно. Інтенсивність процесу обміну іонами виражає ряд, у якому відсоток переміщеного вмісту $Ca^{2+} < Na^+ < K^+$.

10. За дії умов технології кріоконсервації сперми ліміти співвідношень концентрації різнойменних пар іонів у сперматозоїдах становлять: $K^+:Ca^{2+}$ – 2 – 6:1, $Na^+:K^+$ – 2 – 24:1, $Na^+:Ca^{2+}$ – 6 – 73:1; між середовищем і сперматозоїдами – 7 – 53:1, 6 – 38:1, 28 – 100:1, що в 3 – 4 рази більше. Співвідношення концентрації однойменних пар між середовищем і сперматозоїдами $Na^+:Na^+ < K^+:K^+$ і $Ca^{2+}:Ca^{2+}$. Їх числові вирази становлять 2 – 8:1; 2 – 16:1 і 4 – 17 відповідно.

11. Гепаринізоване полікомпонентне захисне середовище забезпечує збереження у деконсервованих спермодозах 40 – 41 % живих і 50 – 53 % клітин без видимих змін структури акросоми й цитоплазматичної мембрани. Це на 11 – 13 % вірогідно ($P < 0,05$) підвищує запліднюваність корів після першого осіменіння.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Для підвищення збереження біологічної повноцінності сперматозоїдів деконсервованих спермодоз лабораторіям біотехнологічного профілю рекомендується використовувати захисне середовище, до 100 см³ дистильованої води якого потрібно додати 6 см³ гепарину, 15 см³ жовтка курячого яйця, 3 см³ гліцерину і 9 г лактози.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Максимюк Г. В. Оцінка впливу умов кріоконсервації на гомеостаз Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у сперматозоїдах і спермальній плазмі / Г. В. Максимюк, Д. З. Воробець, В. М. Максим'юк, Г. В. Зверєва, Б. М. Чухрій, Й. З. Сірацький // Клінічна та експериментальна патологія. – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 116–120. (Особистий внесок

здобувача – планування експерименту, статистичний аналіз даних, обговорення результатів, написання та підготовка публікації до друку).

2. **Максимюк Г. В.** Методика оцінки поліморфізму сперматозоїдів та їх деструкції в умовах кріоконсервації / **Г. В. Максимюк**, 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. (*Особистий внесок здобувача – обговорення результатів електронно-мікроскопічних досліджень, написання та підготовка публікації до друку*).

3. **Максимюк Г. В.** Співвідношення концентрацій Ca^{2+} , K^+ , Na^+ і високомолекулярних жирних кислот у спермальній плазмі / **Г. В. Максимюк**, Д. З. Воробець, З. Д. Воробець, В. М. Максим'юк, Б. М. Чухрій, Й. Ф. Рівіс, Й. З. Сірацький, С. І. Ковтун // Експериментальна фізіологія та біохімія. – 2006. – № 3 (35). – С. 37–45. (*Особистий внесок здобувача – планування експерименту, обговорення результатів, написання та підготовка публікації до друку*).

4. **Максимюк Г. В.** Співвідношення концентрацій Ca^{2+} , K^+ , Na^+ і високомолекулярних насичених неетерифікованих форм жирних кислот між спермальною плазмою та сперматозоїдами / **Г. В. Максимюк** // Медична хімія. – 2007. – Т. 9, № 3. – С. 46–49.

5. **Максимюк Г. В.** Особливості гомеостазу жирних кислот у системі "клітина – середовище" / **Г. В. Максимюк** // Світ медицини та біології. – 2007. – № 4. – С. 14–18.

6. **Максимюк Г. В.** Співвідношення концентрацій Ca^{2+} , K^+ , Na^+ і високомолекулярних жирних кислот у сперматозоїдах / **Г. В. Максимюк**, Д. З. Воробець, З. Д. Воробець, В. М. Максим'юк, Б. М. Чухрій, Й. Ф. Рівіс, Й. З. Сірацький, С. І. Ковтун // Вісник проблем біології та медицини. – 2007. – Вип. 2. – С. 13–19. (*Особистий внесок здобувача – планування експерименту, обговорення результатів, написання та підготовка публікації до друку*).

7. **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.

8. **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. (*Особистий внесок здобувача – планування експерименту, визначення концентрації макроелементів, обговорення результатів, написання та підготовка публікації до друку*).

9. **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. Серія: біологія, медицина. – Дніпропетровськ, 2011. – Вип. 2, т. 1. – С. 81–87. (*Особистий внесок здобувача – планування експерименту, визначення параметрів якості еякуляту, концентрації макроелементів, обговорення результатів, написання та підготовка публікації до друку*).

10. **Максимюк Г. В.** Стандартизована методика визначення ступеня поліморфізму і деструкції сперматозоїдів у нативній і кріоконсервованій спермі / **Г. В. Максимюк**, Д. З. Воробець // Вісник проблем біології і медицини. – 2011.

– Вип. 4. – С. 186–190. *(Особистий внесок здобувача – планування експерименту, розробка методики, обговорення результатів, написання та підготовка публікації до друку).*

11. **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. *(Особистий внесок здобувача – планування експерименту, розробка методики, обговорення результатів, написання та підготовка публікації до друку).*

12. **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. *(Особистий внесок здобувача – планування експерименту, визначення концентрації вільних і зв'язаних іонів лужних металів, обговорення результатів, написання та підготовка публікації до друку).*

13. **Максимюк Г. В.** Зв'язок концентрацій сперматозоїдів та іонів солей лужних металів у спермі / **Г. В. Максимюк**, З. Д. Воробець, В. М. Максим'юк // *Вісник Дніпропетровського університету. Серія: біологія, медицина*. – Дніпропетровськ, 2012. – Т. 3, № 1. – С. 44–53 *(Особистий внесок здобувача – планування експерименту, визначення параметрів якості сперми та концентрації іонів лужних металів, обговорення результатів, написання та підготовка публікації до друку).*

14. **Максимюк Г. В.** Гомеостаз іонів солей лужних металів нативної сперми / **Г. В. Максимюк**, З. Д. Воробець, В. М. Максим'юк // *Медична хімія*. – 2012. – № 3, т. 14. – С. 48–51. *(Особистий внесок здобувача – планування експерименту, визначення концентрації макроелементів, обговорення результатів, написання та підготовка публікації до друку).*

15. **Максимюк Г. В.** 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. *(Особистий внесок здобувача – планування експерименту, визначення концентрації макроелементів, обговорення результатів, написання та підготовка публікації до друку).*

16. **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. *(Особистий внесок здобувача – планування експерименту, визначення концентрації макроелементів, обговорення результатів, написання та підготовка публікації до друку).*

17. **Максимюк Г. В.** Віковий аспект співвідношень концентрації Ca^{2+} , K^+ , Na^+ спермальної плазми і сперматозоїдів / **Г. В. Максимюк** // *Вісник проблем біології і медицини*. – 2013. – Вип. 2 (100). – С. 83–88.

18. **Максимюк Г.** Дія моно- і полікомпонентних розріджувачів сперми на гомеостаз Ca^{2+} , K^+ , Na^+ відкритих систем / **Г. Максимюк**, З. Воробець, Л. Лаповець, О. Першин // *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. – Львів, 2014. – Вип. 65. – С. 355–364. *(Особистий внесок здобувача – планування та проведення)*

експериментів щодо впливу розріджувачів на гомеостаз іонів, статистичний аналіз даних, обговорення результатів, написання та підготовка публікації до друку).

19. **Максимюк А. В.** Механизм адаптации сперматозоидов к действию условий криоконсервации спермы [Электронный ресурс] / **А. В. Максимюк**, З. Д. Воробец // *Universum: Химия и биология: электрон. науч. журн.* – 2014. – № 7 (7). – Режим доступа: <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/1430> (Особистий внесок здобувача – підбір методів дослідження, криоконсервація сперми, обговорення результатів, написання та підготовка публікації до друку).

20. **Максимюк А. В.** Связь параметров концентрации интерлейкинов с показателями спермограммы [Электронный ресурс] / **А. В. Максимюк**, З. Д. Воробец // *Universum: Химия и биология: электрон. науч. журн.* – 2015. – № 5 (13). – Режим доступа: <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/2125> (Особистий внесок здобувача – планування експерименту, підбір методів дослідження, проведення імуноферментного визначення концентрації інтерлейкінів, статистичний аналіз даних, обговорення результатів, написання та підготовка публікації до друку).

21. **Максимюк Г. В.** Вміст іонів лужних металів та ІІ-6 і ІІ-10 у спермальній плазмі / **Г. В. Максимюк**, З. Д. Воробець, В. М. Максим'юк // *Вісник проблем біології і медицини.* – 2015. – Вип. 2, т. 4 (121) – С. 144–147. (Особистий внесок здобувача – планування експерименту, підбір методів дослідження, проведення імуноферментного визначення концентрації інтерлейкінів, статистичний аналіз даних, обговорення результатів, написання та підготовка публікації до друку).

22. **Максимюк Г. В.** Рівень ІІ-6, ІІ-8 і ІІ-10 у спермі чоловіків / **Г. В. Максимюк**, З. Д. Воробець, В. М. Максим'юк // *Світ медицини і біології.* – 2015. – № 3. – С. 64–68. (Особистий внесок здобувача – планування експерименту, підбір методів дослідження, проведення імуноферментного визначення концентрації інтерлейкінів, статистичний аналіз даних, обговорення результатів, написання та підготовка публікації до друку).

23. **Максимюк Г. В.** Іони лужних металів та показники якості нативної і деконсервованої сперми / **Г. В. Максимюк** // *Біологія тварин.* – 2015. – № 3. – С. 72–78.

24. **Maksymyuk H.** The level of proinflammatory and antiinflammatory cytokines in sperm plasma of fertile and infertile men / **H. Maksymyuk**, Z. Vorobets, V. Maksymyuk // *Health Problems of Civilization.* – 2015. – Vol. 9, N 4. – P. 21–25. (Особистий внесок здобувача – планування та проведення експерименту, підбір методів дослідження, статистичний аналіз даних, обговорення результатів, написання та підготовка публікації до друку).

25. **Максимюк Г. В.** Модифікована і стандартизована методика визначення активності транспортних АТФаз за концентраціями білка і фосфору в спермі / **Г. В. Максимюк** // *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького.* – Львів, 2010. – Ч. 1. – Т. 12, № 2 (44). – С. 194–202.

26. **Максимюк Г. В.** 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. (Особистий внесок здобувача – планування

експерименту, визначення концентрації макроелементів, обговорення результатів, написання та підготовка публікації до друку).

27. **Максимюк Г. В.** 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. – Харків, 2013. – № 109, ч. 1 – С. 189–196. *(Особистий внесок здобувача – підбір методів дослідження, обговорення результатів, написання та підготовка публікації до друку).*

28. Патент № 69773 У Україна, МПК G 01N21/00 Спосіб визначення концентрації вільних та зв'язаних іонів у водних екстрактах проб біологічного матеріалу / **Максимюк Г. В.**, Воробець Д. З., Лаповець Л. Є., Санагурський Д. І., Максим'юк В. М.; заявник і патентовласник Львів. нац. мед. ун. ім. Данила Галицького. – № u 201113162; заявл. 08.11.2011; опубл. 10.05.2012, Бюл. № 9. – 4 с. *(Особистий внесок здобувача – планування експерименту, підбір методів дослідження, експериментальні дослідження, обговорення результатів, написання та підготовка до друку).*

29. **Максимюк Г. В.** Технологія одержання сперми і способи оцінки життєздатності сперматозоїдів / В. П. Буркат, О. Є. Гузеватий, Г. М. Седіло, Б. М. Чухрій, В. М. Максим'юк, О. Б. Дяченко, М. М. Максим'юк, Л. І. Яремкевич, Л. Г. Воргуль, М. І. Самарін, І. М. Тимчишин, Й. З. Сірацький, С. І. Ковтун, З. Д. Воробець, **Г. В. Максимюк**, Д. З. Воробець // Методична розробка. – Львів; Оброшино : [Б.в.], 2006. – 42 с. *(Особистий внесок здобувача – обговорення результатів, написання та підготовка матеріалів до друку).*

30. **Максимюк Г. В.** Оцінювання повноцінності стану структури й функцій сперматозоїдів нативної та кріоконсервованої сперми / Г. М. Седіло, В. М. Максим'юк, **Г. В. Максимюк**, Л. Є. Лаповець, Д. З. Воробець, О. Б. Сушко, М. С. Савельєва // Методична розробка. – Львів; Оброшино : [Б.в.], 2014. – 44 с. *(Особистий внесок здобувача – обговорення результатів, написання та підготовка матеріалів до друку).*

31. **Максимюк Г. В.** Сперма, сперматозоїди, відтворювальна здатність / Г. М. Седіло, М. І. Башенко, **Г. В. Максимюк**, З. Д. Воробець, В. М. Максим'юк, О. Б. Сушко, М. С. Савельєва // Методична розробка. – Львів : [Б.в.], 2015. – 134 с. *(Особистий внесок здобувача – обговорення результатів, написання та підготовка до друку).*

32. **Максимюк Г. В.** Особливості співвідношень високомолекулярних жирних кислот у спермальній плазмі бугаїв з різним вмістом Ca^{2+} , K^+ , Na^+ / **Г. В. Максимюк** // Матеріали Міжнародної наукової конференції "Механізми функціонування фізіологічних систем" (Львів, 8–11 листоп. 2006 р.). – Львів, 2006. – С. 91–92.

33. **Максимюк Г. В.** Модифікована і стандартизована методика визначення активності транспортних АТФаз за концентраціями білка і фосфору в спермі / **Г. В. Максимюк** // Матеріали міжнародної науково-практичної конференції "Стан, проблеми та перспективи розвитку сучасної аграрної науки і практики" (Львів, 17–18 черв. 2010 р.). – Львів, 2010. – С. 42.

34. **Максимюк Г. В.** Концентрація та співвідношення макроелементів у спермі / **Г. В. Максимюк** // Таврический медико-биологический вестник: материалы

6-го Конгресса патофизиологов Украины (Симферополь, 3–5 окт. 2012 г.). – Симферополь, 2012. – Т. 15, № 3, ч. 2 (59). – С. 355–356.

35. **Максимюк Г. В.** Іони солей лужних металів тканин системи organa genitalia masculina / **Г. В. Максимюк** // Матеріали Міжнародної наук.-практ. конф. "Наукомісткі технології у сучасному тваринництві" (Харків, 18–19 квіт. 2013 р.). – Харків, 2013. – С. 45.

36. **Максимюк Г. В.** Вміст та співвідношення іонів лужних металів за дії моно- і полікомпонентних розріджувачів сперми / **Г. В. Максимюк** // Здобутки клінічної і експериментальної медицини: матеріали наук.-практ. конф. "Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм" (Тернопіль, 31 жовт.–1 листоп. 2013 р.). – Тернопіль, 2013. – № 12. – С. 262.

37. **Максимюк Г. В.** Динаміка концентрацій Ca^{2+} , K^+ , Na^+ та її відношень між парами іонів у спермі та тканинах репродуктивних органів / **Г. В. Максимюк** // Збірник матеріалів Міжнародної наук.-практ. конф. "Фармацевтичні та медичні науки: актуальні питання" (Дніпропетровськ, 16–17 трав. 2014 р.). – Дніпропетровськ, 2014. – С. 66–67.

38. **Максимюк Г. В.** Вплив кріопротекторів екзо- та ендоцелюлярної дії на стан структури й функцій сперматозоїдів / **Г. В. Максимюк** // Матеріали 6-го Пленуму наукового товариства патофізіологів України та наук.-практ. конфер. за участю міжнародних спеціалістів "Актуальні питання експериментальної та клінічної патофізіології" (Вінниця, 23–25 верес. 2014 р.). – Вінниця, 2014. – С. 55–56.

39. **Максимюк Г. В.** Особливості зв'язку концентрацій іонів солей лужних металів та молекул жирних кислот у спермі / **Г. В. Максимюк** // Матеріали 15-го конгресу СФУЛТ (Чернівці–Київ–Чикаго, 16–18 жовт. 2014 р.). – Чернівці, 2014. – С. 411.

40. **Максимюк Г. В.** Вміст різних форм жирних кислот у спермальній плазмі і сперматозоїдах / **Г. В. Максимюк** // The Ukrainian Biochemical Journal.: Український біохімічний конгрес (Київ, 6–10 жовт. 2014 р.). – Київ, 2014. – V. 86, № 5. – P. 176–177.

41. **Максимюк Г. В.** Кореляція вмісту ПЛ-6 з показниками спермограм неплідних чоловіків / **Г. В. Максимюк** // Збірник тез наукових робіт учасників Міжнародної наук.-практ. конфер. "Ключові питання наукових досліджень у сфері медицини у ХХІ ст." (Одеса, 17–18 квіт. 2015 р.). – Одеса, 2015. – С. 72–74.

42. **Максимюк Г. В.** Зв'язок віку і породи плідників з показниками концентрації іонів солей лужних металів та її відношень у спермі / **Г. В. Максимюк** // Материалы Международной конференции "Развитие науки в ХХІ веке" (Харьков, 11 апр. 2015 г. 2-я част.). – Харьков, 2015. – С. 45–46.

43. **Maksymjuk H. V.** Saturated, unsaturated, etherified and nonetherified fatty acids in high quality sperm / **H. V. Maksymjuk** // Материалы 2-й Международной конференции молодых ученых "Биология: от молекулы до биосферы" (Харьков, 9–21 ноябр. 2007 г.). – Харьков, 2007. – С. 37.

44. **Maksymjuk H. V.** Relationship of ions homeostasis in sperm and germ tissues with sperm viability / **H. V. Maksymjuk** // Vth Lviv-Lublin conference of Experimental and Clinical Biochemistry: abstract book (Lviv, 23–24 may 2013). – Lviv, 2013. – P. 102.

АНОТАЦІЯ

Максимюк Г. В. Біохімічні особливості впливу трансмембранних змін гомеостазу іонів на життєздатність сперматозоїдів за умов кріопротекції. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Інститут біології тварин НААН, Львів, 2016.

Дисертаційна робота присвячена вивченню особливостей зв'язку гомеостазу іонів лужних металів та молекул органічних речовин відкритих і закритих систем зі змінами структури та функцій сперматозоїдів за дії ендо- і екзогенних чинників.

Особливості трансмембранних змін гомеостазу іонів вивчено у групах бугаїв, які продукують еякуляти з низькою, середньою і високою концентрацією K^+ . У спермі з низькими та високими параметрами концентрації K^+ відповідно наявна висока (27,6; 13,2 мг%) і низька (20,4; 8,6 мг%) концентрація лінолевої та ліноленової жирних кислот. Неоднакові рівні концентрації вільних і зв'язаних форм іонів Ca^{2+} , K^+ , Na^+ тканин статевих органів бугаїв і корів координують їх захисну, трофічну, генеративну і транспортну функції. У перфорованих мембранах сперматозоїдів неплідних чоловіків визначили в 1,5; 2,4 та 1,2 разу відповідно вищу активність Na^+/K^+ , Ca^{2+}/Mg^{2+} і Mg^{2+} -АТФаз. У спермальній плазмі неплідних чоловіків концентрація IL-6 і IL-8 в 6,6 та 1,7 разу вища, а IL-10 в 1,4 разу нижча, ніж у плідних. Чинники технології кріоконсервації сперми, моно- і полікомпонентних захисних середовищ призводять до симпортного і/або антипортного переміщення іонів. Результатом дисбалансу гомеостазу є зміни співвідношень концентрації різнойменних пар іонів у сперматозоїдах. Зміни виражено рядом, у якому ліміти співвідношень концентрації $K^+:Ca^{2+} < Na^+:K^+ < Na^+:Ca^{2+}$, що становить 2 – 6:1, 2 – 24:1, 6 – 73:1 відповідно.

Для мінімізації негативного впливу чинників технології кріоконсервації сперми пропонується розроблений лактозо-жовтково-гліцерино-гепариновий розріджувач.

Ключові слова: сперма, сперматозоїди, статеві органи, кріопротектори, захисні середовища, гомеостаз іонів.

АННОТАЦИЯ

Максимюк А. В. Биохимические особенности влияния трансмембранных изменений гомеостаза ионов на жизнеспособность сперматозоидов в условиях криопротекции. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Институт биологии животных НААН, Львов, 2016.

Диссертационная работа посвящена изучению особенностей связи гомеостаза ионов щелочных металлов и молекул органических соединений открытых и закрытых систем с изменениями структуры и функций сперматозоидов под воздействием эндо- и экзогенных факторов.

Особенности трансмембранных изменений гомеостаза ионов изучены в разделенной на составные (спермальна плазма, сперматозоиды) сперме,

соответственно с низкой (12 – 17, 5 – 7 мМ), средней (26 – 31, 10 – 12 мМ), высокой (45 – 52, 15 – 17 мМ) концентрацией K^+ .

Как показывают исследования, ответная адаптивная реакция сперматозоидов на действие физических и химических свойств водных растворов криопротекторов, защитных сред и технологии криоконсервации спермы выражается симпортным и/или антипортным способом перемещения Ca^{2+} , K^+ , Na^+ . Результатом дисбаланса концентрации ионов у сперматозоидах является изменение её соотношений. Величину изменений иллюстрирует ряд разноименных пар, в котором соотношение концентрации $K^+:Ca^{2+} < Na^+:K^+ < Na^+:Ca^{2+}$. Лимиты выявленных изменений составляют 2 – 6:1, 2 – 24:1, 6 – 73:1 соответственно. Изменения между средой и сперматозоидами представляет ряд пар, в котором соотношения концентрации $Na^+:Ca^{2+} < K^+:Ca^{2+} < Na^+:K^+$. Лимиты этих изменений составляют 6 – 38:1, 7 – 53:1, 28 – 100:1, что в 3 – 4 раза больше, чем у сперматозоидах. Соотношения концентрации одноименных пар ($Na^+:Na^+ < Ca^{2+}:Ca^{2+} < K^+:K^+$) только на ± 2 части отличаются от показателей свежеполученной спермы.

Наличие в спермальной плазме эякулятов быков с низкой и высокой концентрацией K^+ соответственно высокой (28; 13 мг%) и низкой (20; 9 мг%) концентрации линолевой и линоленовой кислот может быть причиной низкой устойчивости мембран сперматозоидов к действию факторов ТКС. Различные уровни концентрации свободных и связанных форм Ca^{2+} , K^+ , Na^+ в ФВЕ указывают на то, что барьерная, буферная, компенсаторная роль ионов координирует защитную, трофическую, генеративную, транспортную функции тканей, инициирует пассивное и/или активное перемещение клеток каналами и протоками половых органов быков и коров.

У мембранах сперматозоидов бесплодных мужчин активность транспортных АТФаз выше, чем у здоровых. Показатели концентрации и подвижности сперматозоидов выше, количества их аномальных форм больше. Соотношения концентрации $K^+:K^+$ и $Na^+:Na^+$ между спермальной плазмой и сперматозоидами не подвергаются изменениям. Спермальная плазма бесплодных мужчин содержит достоверно более высокий уровень концентрации провоспалительных интерлейкинов (IL-6, IL-8) и менее низкий – противовоспалительных (IL-10), чем у здоровых.

Для коррекции дисбаланса ионов, минимизации вредоносного влияния факторов ТКС и определения оптимальных доз криопротекторов при создании новых ЗС обоснована возможность использования способности производителей выделять сперму с индивидуальной постоянно низкой, средней и высокой концентрацией K^+ .

Формулу ($\Delta = x \pm x_i$) определения степени абсолютных и относительных изменений структуры и функций сперматозоидов предложено использовать в качестве модели (инструмента) объективной оценки степени вредоносного влияния экзогенных факторов на клетку при воздействии условий технологии криоконсервации спермы до $-196^\circ C$.

Ключевые слова: сперма, сперматозоиды, половые органы, криопротекторы, защитные среды, гомеостаз ионов.

SUMMARY

Maksymyuk H. V. Influence of the biochemical features of transmembrane changes in ion homeostasis on the sperm viability under cryopreservational conditions. – Manuscript.

The thesis for the degree of doctor of biological sciences, specialty 03.00.04 – biochemistry. – Institute of animal biology NAAS, Lviv, 2016.

The thesis is to the study the features of relationship between homeostasis of alkali metal ions and molecules of organic matters in open and closed "environment–cell" systems with the changes in the structure and function of sperm under the influence of endogenous and exogenous factors.

Specifics of transmembrane changes in ion homeostasis was studied in the groups of bulls that produce ejaculates with low, medium and high K^+ concentrations. Sperm with low and high K^+ concentration parameters has high (27,6, 13,2 mg%) and low (20,4, 8,6 mg%) concentrations of linoleic and linolenic fatty acids respectively. Unequal concentrations of free and bound forms of Ca^{2+} , K^+ , Na^+ ions in bulls and cows genital tissues, coordinate their protective, trophic, generative and transport functions. The activity of the Na^+/K^+ -, Ca^{2+}/Mg^{2+} - i Mg^{2+} - ATPases was 1,5, 2,4 and 1,2 times higher respectively in the perforated membranes of the infertile men sperm. The infertile men spermal plasma concentrations of IL-6 and IL-8 was 6,6 and 1,7 times higher, and IL-10 was 1,4 times lower than fertile men plasma. Factors of sperm cryopreservation technology as well as mono- and multicomponent protective environments lead to symport and/or antyport ion movement. The result of homeostasis imbalance is the change in concentration ratios of dissimilar ion pairs in spermatozoa. The variance of values is expressed by a series with limits $K^+:Ca^{2+} < Na^+:K^+ < Na^+:Ca^{2+}$, which is 2 – 6: 1, 2 – 24: 1, 6 – 73: 1, respectively.

To minimize the negative impact of semen cryopreservation technology factors, the newly developed lactose-yolk-glycerol-heparin diluent is offered.

Keywords: sperm, spermatozoa, genitals, cryoprotectants, protective environments, ions homeostasis.

Підписано до друку: 25.01.16 р. Формат 60x90/16.
Гарнітура Times New Roman. Папір офсетний.
Умов. друк. арк. 1,9 Тираж 100 прим.
ЛНМУ ім. Данила Галицького
вул. Пекарська, 69 м. Львів 79010