

М. В. ЗУБЕЦЬ, Т. Ю. ЩОГОЛЕВА, В. Г. КОЛЕСНІКОВ

## ПРИЖИТТЄВИЙ КОНТРОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНИХ МЕХАНІЗМІВ СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ СПЕРМІЯ

*Наведено результати аналізу стану спермій в умовах неруйнучого контролю методом КВЧ-діелектрометрії.*

Незважаючи на значні успіхи, досягнуті в кріоконсервації клітин, розробка оптимальних умов ще потребує істотної доробки і глибокого поняття фундаментальних основ функціонування її молекулярних механізмів. Тільки таким чином можливий розвиток високоефективних технологій у тваринництві. Наприклад, аналіз стану слабких зв'язків між білками і ліпідами у мембрані дав можливість розробити високоякісні середовища для кріоконсервації, які використовуються до теперішнього часу [1, 2].

Метою цієї роботи є аналіз структурно-функціонального стану спермій на різних етапах підготовки еякуляту до заморожування. При розробці методів збереження сперми насамперед намагаються знизити обмінні процеси, щоб притримати розклад речовин і нагромадження токсичних продуктів обміну. Стабілізацію морфофункціональних показників залежно від складу середовищ розглянуто в багатьох роботах. Основні компоненти синтетичних середовищ — неелектроліти, електроліти, кріопротектори, жовток, антиоксиданти, буферні системи, антибіотики. Ступінь відновлення рухливості спермій після розмножування залежить від збереження їх структурно-функціональної організації після холодового удару, яка насамперед залежить від гідратного оточення всіх структурних компонентів клітини і стану вільної води в клітині. Наприклад, ефективність дії дисахаридів, що широко використовуються на практиці, пояснюється їх здатністю більшою мірою структурувати воду ніж моносахариди [1, 2]. Діелектрометрія біологічних об'єктів дає можливість розв'язати ці задачі, оскільки об'єкт дослідження вивчається в умовах, що не призводять до його руйнування.

© М. В. Зубець, Т. Ю. Щоголева,  
В. Г. Колесніков, 1998

Розведення і генетика тварин. 1998. Вип. 29

Методом діелектрометрії на частоті 8,7 ГГц по переміні діелектричної проникливості суспензії спермів від концентрації введеного жовтка, було проведено розрахунок об'єму і товщини утвореної оболонки на поверхні мембрани спермів і розглянуто механізми захисту клітини яєчним жовтком (Душейко О. І., 1972). Такий підхід у діапазоні мм хвиль дає можливість аналізувати в реальному часі не тільки структурно-функціональний стан мембран, але і всієї клітини до, у процесі і після консервування, а також стану водного компонента клітини і гідратного оточення її компонент (Шоголева Т. Ю., 1988). Час виміру принципово важливий особливо для спермів, так як функції цих клітин істотно змінюються протягом кількох годин, залежать від температури, рН середовища тощо.

Стан клітини проаналізовано методом КВЧ-діелектрометрії у галузі дисперсії вільної води на частоті 39,5 ГГц протягом перших годин витримки сперми при температурі 20 °С у різних розріджувачах і без них.

Методика досліджень. Експеримент ставився протягом року на групі племінних бугаїв у різні періоди їх утримання на базі Інституту розведення і генетики тварин УААН. Під час підбору речовин для скринінга використовували 10 племінних бугаїв різних порід класу еліта-рекорд Київського ОПО (м. Бровари). Бугаї-виробники цього класу є поліпшувачами за показниками молочної продуктивності дочок. Враховувались показники тварин: маса, вік, об'єм сякуляту, запліднювальна здатність сперми, продуктивність дочок у поколіннях тощо.

В експерименті використано сякулят у перші години після одержання сперми. Якість сперми контролювалась мікроскопією — оцінювалась за балами та концентрацією сперми. Для визначення експериментальної помилки від розкиду концентрації спермів у сякуляті було знято на КВЧ-діелектрометрії концентраційні залежності комплексної діелектричної проникненості від кількості клітин у пробі, які дали можливість кількісно зрівнювати результати. Приведення до єдиної концентрації проведено в більшості дослідів для статистичного аналізу результатів.

Попередня підготовка проб суспензії клітин здійснювалась у два етапи. Перший етап — це приведення суспензій клітин до єдиної концентрації — до єдиного кількісного показника в оптичній густині, що дає можливість досягти приблизно однакової концентрації проб суспензії в межах помилки діелектрометра. Об'єм розчину (розріджувача), який додається до проби, визначається за формулою:

$$\Delta V_2 = V_2 \frac{\Delta V}{V''},$$

де  $\Delta V_2$  — об'єм розчину (розріджувача), який додається до проби для діелектрометрії;  $V_2$  — об'єм взятої для дослідження вихідної суспензії;  $V''$  — об'єм залитої в кювету ФЕКа точно розведеної проби сперми;  $\Delta V$  — об'єм розріджувача, який треба додати в кювету ФЕКа, щоб урівняти концентрації.

Однак, як показує експеримент, така обробка зменшує розкид при визначенні відмінностей показників незначною мірою. Це дає можливість зробити висновок, що цей розкид у дослідях визначається індивідуальними відмінностями особин [3].

Другий етап — вплив на клітини *in vitro* біологічно активними реагентами. Ці експерименти проводились тільки з нативною спермою в умовах які виключають її руйнування в процесі вимірювання. Еякулят кожного бугая з підготовленою для вимірювання концентрацією розливали мікродозатором (0,1–0,2 мл) по комірках імунологічного планшета, в які і добавляли біологічно активні реагенти каліброваними мікропіпетками в кількості 0,01–0,005 мл при обов'язковому перемішуванні еякуляту до початку заливки проби в комірку діелектрометра. Схема приготування суміші з однією, двома, трьома і чотирма добавками забезпечує постійність концентрації у межах чутливості КВЧ-діелектрометра. Об'єм добавки визначається з урахуванням мінімальної дози, яку можливо точно відміряти мікропіпеткою при доливанні розчину впливаючого реагента. Об'єм хвилепровідної комірки не лімітує в цьому відношенні хід експерименту. Окремі групи дослідів ставилися з використанням стандартних розріджувачів: лактозного і цитратного.

Вимірювання виконувались, починаючи з перших хвилин взаємодії добавок з еякулятом протягом декількох годин. При цьому використовувався КВЧ-діелектрометр останньої модифікації, виготовлений в науково-дослідній лабораторії управляючих клітинних комплексів і випробований протягом 1992–1993 рр. Об'єм комірки діелектрометра — 0,005 мл, заливка здійснювалась мікродозатором.

Результати досліджень. Протягом перших годин експериментів відмічено значні зміни в структурному стані кліткових компонентів, які ще не відбиваються на рухливості спермій, але виявляються причиною загибелі клітин у наступні доби. Зменшення рухливості спермій корелює із зміною стану спермій, який визначається за діелектричною проникненістю, але, на відміну від монотонного падіння рухливості спермій від часу, а також добре відомих залежностей переживання спермій у

різних розріджувачах, які також мають монотонний характер, на кривих залежності діелектричної проникненості від часу в різних розріджувачах і при різних стимуляторах є особливості у вигляді піків. У роботі [4] проаналізовано реагування клітин спермійв на стимуляцію: гормонами різного молекулярного механізму дії — катехоламінами, кортикостероїдами і модуляторами гормональної активності, цитостатиками. Інтегральні зміни клітини, що спостерігались по зміні загального її гідратного оточення, указують на включення ланцюга макромолекулярних компонентів спермія як при трансмембранній передачі сигналу, так і при руйнуванні цитокаркасу. У ряді випадків ефекти по  $E$  досягають 15 %. Падіння рухливості, що спостерігалось за залежністю  $E$  від часу, присутністю різних добавок, зроблених протягом першої години обробки еякуляту, супроводжується конформаційними перетвореннями, які впливають на найважливіші компоненти мембрани і цитокаркасу.

Загибель сперми без розріджувача і в різних розріджувачах спостерігається як за падінням рухливості, так і за зміною інтегрального параметра  $E^2$ , а також за згасанням відповідей усіх випробуваних молекулярних механізмів. Спектрограма впливу адреналіну, лідоксіну і дексаметазону після 3–5 год витримування сперми з розріджувачем при кімнатній температурі (20 °C) свідчить, що клітини практично не реагують на біохімічний вплив.

Нами було досліджено вплив різних розріджувачів на молекулярний механізм клітини. Зміна діелектричної проникненості суспензії клітин по відношенню до води у цитратному і лактозному розріджувачах відрізняється, але по відношенню до розріджувача ідентичні. Не спостерігається пригнічення молекулярних механізмів АЦС, цитокаркасу, рецепторних комплексів у мембрані. Використані стандартні розріджувачі істотно впливають на реакції клітин і є індіферентним фоном. При цьому вони різко стабілізують стан спермійв, можливо, за рахунок неспецифічного впливу (рис. 1). На рис. 2 показано приклади індивідуальної реакції спермійв різних бугаїв на дію адреналіну, а також зміну цієї реакції у процесі утримання тварин у різні дні одержання еякуляту. Це корелює з відомими даними про залежність морфології спермія від годівлі тварини [1, 2], але на відміну від раніш застосованих методів, метод КВЧ-діелектрометрії дає можливість не тільки зафіксувати факт відмінності, але і проаналізувати його молекулярні механізми у кожному конкретному випадку, розробити експрес-тестування і експрес-кореляцію.

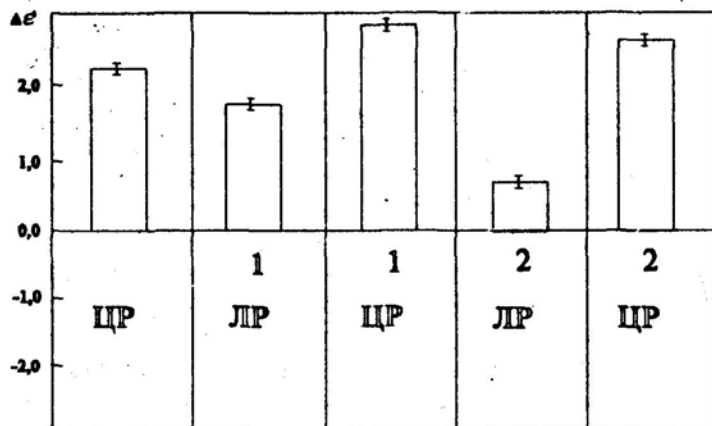
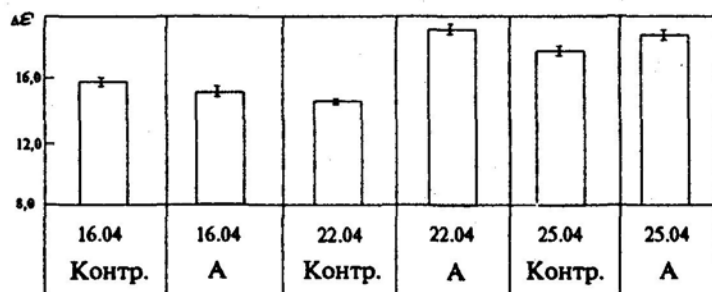
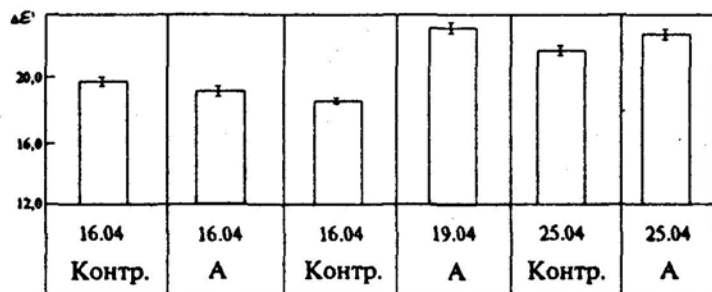


Рис. 1. Відмінності дійсної частини діелектричної проникненості ( $\Delta\epsilon'$ ) суспензії спермія від лактозного розріджувача на фоні лактозного (ЛР) і цукратного (ЦР) розріджувачів:  
1, 2 – різні бугаї



а)



б)

Рис. 2. Можливість дійсної частини діелектричної проникненості суспензії сперміїв від впливу адреналіну (А) в різні дні одержання сякуляту:  
а, б – різні бугаї

У результаті досліджень виявлено сезонні варіації якості сперми в одних і тих же виробників, які безумовно мають місце на фоні індивідуальних особливостей і стану одного і того самого бугая в різні дні одержання еякуляту. Підтверджено зміни якості еякуляту від різних садок одного і того самого виробника. Такий підхід дає можливість аналізувати молекулярні механізми, зумовлені тим, що залежно від часу відбуваються зміни в клітині, а також контроль і регулювання процесу за допомогою КВЧ-електрометра.

**Висновки.** Робота із живою клітиною в перші години дає унікальну можливість індивідуально проаналізувати стан як клітини, так і всього організму. Умови зберігання сперми, якість кріопроекторів, що використовуються, і пошук їх оптимальних сполучень для одержання високого відсотка виживання можливо контролювати, оцінюючи стан спермій за реакціями клітин на всі етапи приготування, зберігання і використання сперми.

1. *Осташко Ф. Н.* Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. — Киев: Урожай, 1978. — 193 с.

2. *Наук В. А.* Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервировании. — Кишинев: ШТИИИИЦА, 1991. — 171 с.

3. *Малая Л. Т., Щеголева Т. Ю., Бахова Л. К.* // Физиологический журнал. — 1986. — № 2. — С. 131–135.

4. *Зубец М. В., Щеголева Т. Ю., Колесников В. Г.* Применение мм диапазона длин волн в сельском хозяйстве. — Киев: Аграрна наука, 1995. — С.