



УДК 612.616.2.015.7

## СТАНДАРТИЗОВАНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ І ПЕРЕМІЩЕНОЇ КІЛЬКОСТІ $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ У СИСТЕМІ "КЛІТИНА-СЕРЕДОВИЩЕ"

<sup>1</sup>Максим'юк Г.В., <sup>2</sup>Максим'юк В.М.

<sup>1</sup>Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України,  
hanna.maksytjuk@gmail.com

<sup>2</sup>Інститут землеробства і тваринництва західного регіону НААН України,  
Львів-Оброшино, Україна

Надійшла до редакції 27.03.2011

Для об'єктивного контролю за функціональним станом ізольованих клітин (сперматозоїди) пропонуємо розроблену і стандартизовану методику визначення динаміки концентрації та переміщеної кількості (вмісту) іонів макро- і мікроелементів у системі "клітина-середовище" методом полуменевої і/або атомноадсорбційної спектروفотометрії.

**Ключові слова:** еякуляти, спермальна плазма, сперматозоїди, кальцій, калій, натрій, концентрація і переміщена кількість іонів, полуменева фотометрія.

### ВСТУП

Відомо, що об'єктивний аналіз "реакції-відповіді" біологічних систем на негативну або позитивну дію екстремальних чинників впливу може бути забезпечений лише за умови експериментально визначених вірогідних показників змін їх нормального стану [1, 2]. Однак, сучасні методи оцінки функціонального стану клітин не завжди відповідають вимогам практики. Тому впровадження нових методичних прийомів досліджень дозволить об'єктивно оцінювати, корегувати і розробляти ефективні способи і засоби захисту життєздатності клітин за екстремальних умов.

Оскільки об'єктивна оцінка рівноваги вмісту  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  у системі "клітина-середовище" [10] є важливою частиною активного і пасивного процесу регуляції балансу іонів макро- та мікроелементів, то ми сподіваємося, що розроблена методика визначення параметрів концентрації іонів на різних етапах кріоконсервації буде корисною для оцінки і корекції функціонального стану ізольованих клітин, дозволить розробити нові способи ефективного захисту їх життєздатності.

Мета роботи – впровадити у науково-дослідну і практичну роботу лабораторій, установ кріобіологічного та біотехнологічного профілю, вищих закладів освіти, контролюючих організацій, тощо визначення динаміки показників концентрації (вмісту) іонів макро- та мікроелементів в якості об'єктивних параметрів контролю за функціональним

станом ізольованих клітин у системі "клітина - середовище".

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Об'єктом наших досліджень є динаміка концентрації і переміщеної кількості  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  у системі "сперматозоїди - спермальна плазма" за умов кріоконсервації сперми методом полуменевої фотометрії.

Для проведення визначень застосовують такі засоби виміральної техніки, допоміжне обладнання, реактиви і матеріали, як фотометр полуменевої; мікроскоп біологічний; дозатор рідин автоматичний А-2; ваги аналітичні; термостат повітряний або шафа сушильна; гомогенізатор; вода дистильована; центрифуга лабораторна; глутаральдегід ( $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_3$ ); кальцій вуглекислий ( $\text{CaCO}_3$ ); натрію хлорид ( $\text{NaCl}$ ); калію хлорид ( $\text{KCl}$ ); кислота соляна ( $\text{HCl}$ ); кислота сірчана ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ); калій двохромовокислий ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ); спирт етиловий ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ); натрію цитрат (2,9% нейтралізований розчин  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ); азот рідкий; пробірки центрифужні або флакони місткістю 5-6  $\text{cm}^3$  і 13-14  $\text{cm}^3$ ; колби мірні 0,5 і 1,0  $\text{dm}^3$ ; стакани хімічні 25 і 50  $\text{cm}^3$ ; піпетки мірні 1,0 і 0,1  $\text{cm}^3$ ; скельця покривні; скельця предметні; палички скляні; вата; лейкопластир; балони газові для повітря, пропан-бутанової суміші, ацетилену; термоси Дюара; папір для етикеток; папір фільтрувальний лабораторний; пластини фторопластові; пінцети; ножиці; ванна для рідкого азоту.

Всі реактиви мають бути кваліфікації х.ч. або ч.д.а. Дозволяється використовувати інші засоби вимірювальної техніки, допоміжне обладнання, реактиви і матеріали, які за якістю та характеристиками не гірші за наведені.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### Порядок виконання робіт.

**1. Виготовлення запасних, основних і робочих розчинів.** Для приготування запасних і основних розчинів, а також концентраційних рядів робочих розчинів використовують солі  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{NaCl}$  і  $\text{KCl}$ , які висушують до постійної маси у сушильній шафі (термостаті) за температури  $(110-120)^\circ\text{C}$ . Контроль за зміною маси солей здійснюють на аналітичних вагах. Висушені солі зберігають у скляному, з притертим корком, хімічному посуді.

**1.1 Запасні розчини.** Готують з наважки солей, маса яких для  $\text{CaCO}_3$  становить 2,497 г,  $\text{NaCl}$  - 1,907 г,  $\text{KCl}$  – 2,542 г. Кожну окремо взятую наважку засипають у колбу місткістю 1,0  $\text{дм}^3$ .

Солі  $\text{NaCl}$  і  $\text{KCl}$  розчиняють у 100-200  $\text{см}^3$  бідистильованої води;  $\text{CaCO}_3$  - в 20  $\text{см}^3$   $\text{HCl}$ , розведеної у співвідношенні 1:1 бідистильованою водою. Об'єм запасних розчинів доводять водою до мітки 1,0  $\text{дм}^3$ . При цьому кінцева концентрація  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$  у них становить **1000  $\text{мг/дм}^3$** .

**1.2 Основні розчини.** З колби місткістю 1,0  $\text{дм}^3$  відбирають 50  $\text{см}^3$  запасного розчину. Відібраний розчин переносять у колбу місткістю 0,5  $\text{дм}^3$  і до мітки 0,5  $\text{дм}^3$  доливають бідистильованою водою. Після проведених маніпуляцій концентрація  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  в основних розчинах становить **100  $\text{мг/дм}^3$** .

**1.3 Робочі розчини.** З основних розчинів готують серію робочих розчинів, концентрація  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  у яких становить **50, 20, 10, 5, 2 і 1  $\text{мг/дм}^3$**  (таблиця 1).

Для визначення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  у робочих розчинах і дослідних пробах використовують

металеві інтерференційні світлофільтри ( $\text{Ca}^{2+}$  - 621 нм,  $\text{Na}^+$  - 588 нм,  $\text{K}^+$  - 767 нм). Показник витрат повітря фіксують на рівні 250  $\text{дм}^3/\text{год}$ , ацетилену – 40  $\text{дм}^3/\text{год}$ , пропан-бутанової суміші – 13-18  $\text{дм}^3/\text{год}$ . Полуменевий фотометр вмикають в електромережу і через 10-15 хв після стабілізації роботи вимірювальної системи приступають до юстування шкали приладу.

Капіляр подачі розчинів (проб) вводять у стакан з бідистильованою водою, запалюють газовий пальник і виставляють стрілку гальванометра на нульову позначку. Місцезнаходження ручки переведення діапазонів [(0-10) поділок] чутливості приладу - залежить від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  у робочих розчинах. Максимальне значення шкали гальванометра для найвищої концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  становить 8  $\text{mv}$ ,  $\text{Na}^+$  - 120  $\text{mv}$ ,  $\text{K}^+$  - 100  $\text{mv}$ .

Калібрувальні криві будують за визначеними у робочих розчинах концентраціями  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ . На графік наносять середні величини показників шкали приладу, отримані за результатами двох вимірювань. Вимірювання проводять від розчину № 6 до № 1. Покази приладу записують у лабораторний журнал і будують калібрувальні криві.

Покази шкали гальванометра, діапазон якої для  $\text{Ca}^{2+}$  становить 0-8  $\text{mv}$ ,  $\text{Na}^+$  – 0-120  $\text{mv}$ ,  $\text{K}^+$  – 0-100  $\text{mv}$ , наносять на вісь ординат (y), а на вісь абсцис (x) - концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  в діапазоні (0-100)  $\text{мг/дм}^3$ . За потреби крайню позначку максимальної концентрації іонів у розчинах 100  $\text{мг/дм}^3$  можна міняти на 50, 20, 10 або 5  $\text{мг/дм}^3$   $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , а саме: 100, 50, 20, 0 на 50, 20, 10, 0; 20, 10, 5, 0; 10, 5, 2, 0 чи 5, 2, 1, 0 (рис. 1).

Таблиця 1

Схема приготування робочих розчинів

Робочі розчини*, №	Об'єм основного розчину, $\text{см}^3$	Об'єм бідистильованої води, $\text{см}^3$	Концентрація робочих розчинів, $\text{мг/дм}^3$
1	250	250	50
2	100	400	20
3	50	450	10
4	25	475	5
5	10	490	2
6	5	495	1

\*Робочі розчини використовуються до часу появи у колбах осаду.

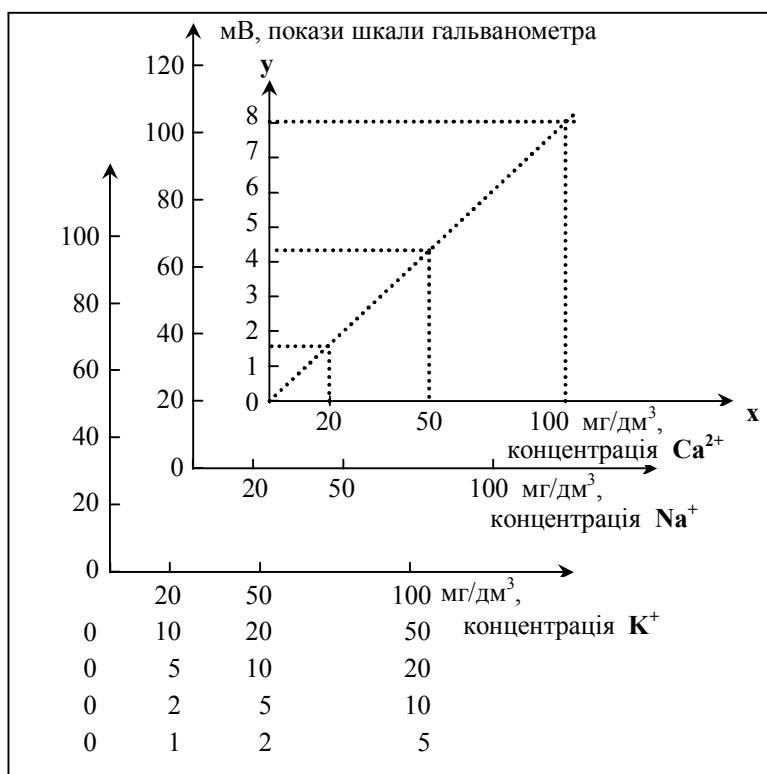


Рис. 1. Схема побудови калібрувальних кривих для визначення концентрації Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>.

### 3. Визначення концентрації Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>.

Свіжоотриману нативну (нерозріджену) сперму об'ємом 0,5 см<sup>3</sup> переносять у центрифужну пробірку (флакони) і, з метою фіксації білків акросоми та цитоплазматичної мембрани сперматозоїдів (поперечне зшивання молекул), додають одну краплю 2%-вого розчину глутаральдегіду. Фіксатор змішують зі спермою, витримують впродовж 10-15 хв і центрифугують протягом 5 хв за 800 г. Після зупинки центрифуги спермальну плазму відокремлюють від клітин.

Автоматичним дозатором рідин у центрифужні пробірки (флакони) доливають по 4,5 см<sup>3</sup> бідистильованої води. Відцентрифужовані клітини гомогенізують до дрібнодисперсної однорідної суспензії, спермальну плазму ретельно перемішують і визначають концентрацію Ca<sup>2+</sup>. Результати вимірювань заносять у лабораторний журнал.

Для визначення концентрації Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> до суспензії клітин додають 5 см<sup>3</sup>, а до спермальної плазми – 10 см<sup>3</sup> бідистильованої води. У додатково розведених пробах спочатку визначають концентрацію Na<sup>+</sup>, потім – K<sup>+</sup>. Якщо стрілка гальванометра виходить за межу максимального значення шкали приладу (Na<sup>+</sup> - 120 мВ, K<sup>+</sup> – 100 мВ), то проби розводять, доливаючи по 5 см<sup>3</sup> бідистильованої води.

Кінцеву концентрацію іонів у дослідних пробах знаходять за калібрувальною кривою графіку, яку будують за знятими зі шкали приладу показами концентрацій робочих розчинів. Для подання експериментальних даних за міжнародною системою одиниць (СИ), визначену у мг/дм<sup>3</sup> концентрацію іонів можна перерахувати у ммоль/дм<sup>3</sup> (мМ), а саме: враховуючи ступінь розведення проб, результати

вимірювань перемножують на коефіцієнти перерахунку (Ca<sup>2+</sup> – 0,02495, K<sup>+</sup> – 0,02597, Na<sup>+</sup> – 0,0435).

При встановленні ступеня впливу етапу еквілібрації сперми на гомеостаз іонів у системі "клітина-середовище" від залишених за температури 2-4 °С на 4 год в холодильнику проб об'ємом 2,4 см<sup>3</sup> відбирають 1,0 см<sup>3</sup> розрідженої сперми. Операції з визначення концентрації Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> у плазмі та сперматозоїдах повторюють за наведеною вище схемою. Рухливість сперматозоїдів у пробах (бал, %) контролюють методом світлової мікроскопії, концентрацію (млрд/см<sup>3</sup>) – методом фотоелектроколориметрії.

### 4. Технологія кріоконсервації сперми (приклад).

Еквілібровану сперму об'ємом 1,0 см<sup>3</sup> заморожують на розміщеній над ванною з рідким азотом фторопластовій пластині. На пластину наносять 0,1, 0,2 або 0,5 см<sup>3</sup> досліджуваної проби, отримуючи 10, 5 або 2 гранули, відповідно. Гранули зберігають не менше двох днів у термосах Дюара, заповнених рідким азотом, за температури мінус 196 °С; розморожують за температури 38±0,5 °С в 1,0 см<sup>3</sup> 2,9%-вого розчину нейтралізованого цитрату натрію. Після зникнення останнього кристаліка льоду у пробах знову визначають концентрацію Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> і рухливість сперматозоїдів.

#### 4.1 Визначення переміщеної кількості Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>.

4.1.1 Визначення абсолютних показників переміщеної кількості Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>. Оцінку змін рівноваги вмісту (гомеостазу) іонів у системі "клітина-середовище" проводять у три етапи. Перший

- спрямований на визначення концентрації іонів. На даному етапі досліджень визначають концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  у сперматозоїдах із свіжоотриманої ( $x_1$ ),

розрідженої ( $x_2$ ), еквіліброваної ( $x_3$ ) і деконсервованої ( $x_4$ ) сперми (таблиця 2).

Таблиця 2

Концентрація іонів у сперматозоїдах при заморожуванні сперми, мМ

Іони	Сперма			
	свіжоотримана	розріджена	еквілібрована	деконсервована
$\text{Ca}^{2+}$	1,27	1,53	1,72	0,94
$\text{Na}^+$	19,02	15,43	15,15	41,36
$\text{K}^+$	14,99	13,99	13,89	3,77
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$

\*  $x_1, x_2, x_3, x_4$  – концентрація іонів на етапах криоконсервації сперми.

Таблиця 3

Вплив умов криоконсервації на гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , мМ

Іони	Абсолютні показники впливу:			
	Прямий			Сумарний
	розрідження	еквілібрації	деконсервації	
$\text{Ca}^{2+}$	+ 0,26	+ 0,19	- 0,78	- 0,33
$\text{Na}^+$	- 3,59	- 0,28	+ 26,21	+ 22,34
$\text{K}^+$	- 1,00	- 0,10	- 10,12	- 11,22
	$A_{\Pi}^1 = x_1 - x_2^*$	$A_{\Pi}^2 = x_3 - x_2^*$	$A_{\Pi}^3 = x_3 - x_4^*$	$A_c = x_4 - x_1^*$

$x_2 - x_1, x_3 - x_2, x_4 - x_3$  - переміщена кількість  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  у сперматозоїди (+) та вихід з них (-) після розрідження, еквілібрації і деконсервації сперми;  $x_4 - x_1$  - за повний цикл криоконсервації (свіжоотримана ... деконсервована);

$A_{\Pi}^{1...3}$  - абсолютні показники прямого,  $A_c$  – сумарного впливу умов криоконсервації.

Таблиця 4

Вплив умов криоконсервації на гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , %

Іони	Відносні показники впливу:			
	Прямий			Сумарний
	розрідження	еквілібрації	деконсервації	
$\text{Ca}^{2+}$	+ 78,8	+ 57,6	- 236,4	- 26,0
$\text{Na}^+$	- 16,1	- 1,3	+ 117,3	+ 117,5
$\text{K}^+$	- 8,9	- 0,9	- 90,2	- 74,9
	$B_{\Pi}^1 = \frac{(x_2 - x_1) \cdot 100^*}{x_4 - x_1}$	$B_{\Pi}^2 = \frac{(x_3 - x_2) \cdot 100^*}{x_4 - x_1}$	$B_{\Pi}^3 = \frac{(x_4 - x_3) \cdot 100^*}{x_4 - x_1}$	$B_c = \frac{(x_4 - x_1) \cdot 100^*}{x_1}$

\*  $(x_2 - x_1), (x_3 - x_2), (x_4 - x_3)$ - переміщена кількість  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  у сперматозоїди (+) та вихід з них (-) після розрідження, еквілібрації і розморожування сперми;  $x_4 - x_1$  - за повний цикл криоконсервації (свіжоотримана ... деконсервована) сперми;  $B_{\Pi}^{1...3}$  - відносний показник прямого,  $B_c$  – сумарного впливу умов криоконсервації.

На другому етапі визначень (таблиця 3) знаходять абсолютні показники (мМ) переміщеної кількості іонів у сперматозоїди або виходу з них (антипорт, симпорт), а саме: після розрідження ( $x_2 - x_1$ ), еквілібрації ( $x_3 - x_2$ ), деконсервації ( $x_4 - x_3$ ) та за повний цикл ( $x_4 - x_1$ ) криоконсервації (свіжоотримана деконсервована) сперми.

Для цього від більшої величини визначеного показника віднімають меншу і встановлюють абсолютну величину переміщеної кількості іонів (мМ) та оцінюють особливості їх переміщень у системі

"клітина-середовище". Для зручності аналізу даних вхід іонів у клітину позначають знаком плюс (+), вихід з них – знаком мінус (-).

**Приклад розрахунків.** Визначені згідно з формул:

$$A_{\Pi}^1 = 1,53 - 1,27, A_{\Pi}^2 = 1,72 - 1,53, A_{\Pi}^3 = 1,72 - 0,94,$$

$$A_c = 1,27 - 0,94$$

абсолютні показники переміщеної кількості (вмісту)  $\text{Ca}^{2+}$  після розрідження, еквілібрації, деконсервації (прямий вплив) та від отримання до

деконсервації сперми (сумарний вплив) становлять +0,26, +0,19, -0,78 та -0,33 мМ, відповідно. Аналогічно обчислюють переміщену кількість  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$ .

**4.2.2 Визначення відносних показників переміщеної кількості  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ .** Третій етап аналізу визначених показників концентрації іонів спрямований на встановлення прямого впливу умов кріоконсервації і кріопротекторів на гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  у системі "клітина-середовище" (таблиця 4).

Вплив умов кріоконсервації на рівновагу вмісту (гомеостаз) іонів виражають відносними (відсотковими) величинами. Кількість іонів, що переміщуються (вхід-вихід) у системі "клітина-середовище" від одержання до деконсервації сперми ( $x_4-x_1$ ), приймають за 100%, переміщену на відповідному етапі технологічного циклу кількість ( $x_2-x_1$ ,  $x_3-x_2$ ,  $x_4-x_3$ ) – за  $x$ . Із складених рівнянь знаходять ступінь прямого впливу на сперматозоїди кожного наступного етапу кріоконсервації щодо попереднього.

Визначають також сумарний вплив всіх етапів кріоконсервації на гомеостаз іонів. Початковий рівень концентрації іонів у сперматозоїдах свіжоотриманих еякулятів ( $x_1$ ) приймають за 100%-ів, переміщену кількість іонів ( $x_4-x_1$ ) - за  $x$  і знаходять ступінь впливу умов кріоконсервації (концентрація кріопротекторів, температура, осмотичний тиск, рН захисних середовищ, тощо) на гомеостаз іонів у спермі.

**Приклад розрахунків.** Визначені згідно з формул:

$$B_n^1 = \frac{0,26 \cdot 100}{0,33}, \quad B_n^2 = \frac{0,19 \cdot 100}{0,33}, \quad B_n^3 = \frac{0,78 \cdot 100}{0,33},$$

$$B_c = \frac{0,33 \cdot 100}{1,27}$$

відносні показники переміщеної кількості (вмісту)  $\text{Ca}^{2+}$  після розрідження, еквілібрації, деконсервації (прямий вплив) та від отримання до деконсервації сперми (сумарний вплив) становлять 78,8%, 57,6%, мінус 236,4% та мінус 26,0%-ів, відповідно. Аналогічно обчислюють переміщену кількість  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$ .

За кінцевий результат приймають отриману з трьох визначень середньоарифметичну величину ( $\bar{M}$ ). Похибка результатів визначень не повинна перевищувати  $\pm 5\%$ .

## ВИСНОВКИ

Визначені показники свідчать, що із сперматозоїдів у середовище для деконсервації сперми (2,9%-вий нейтралізований розчин цитрату натрію) виходить 0,33 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  і 11,22 мМ  $\text{K}^+$ , що

становить 25 % і 75 % їх початкового вмісту, але із середовища у сперматозоїди входить 22,34 мМ  $\text{Na}^+$ , або 117 % їх початкового вмісту 19,02 мМ у сперматозоїдах. Це означає, що після розрідження сперми антипортне переміщення у сперматозоїди 79 % вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  витісняє з клітин 16%  $\text{Na}^+$  і 9%  $\text{K}^+$ . Впродовж еквілібрації сперми інтенсивне переміщення  $\text{Ca}^{2+}$  (58%) у сперматозоїди триває. Однак вихід  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$  з клітин несуттєвий. Після деконсервації гранул величина переміщеної кількості  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  є найбільшою. У сперматозоїди переміщається 117 % вмісту  $\text{Na}^+$ , який витісняє з клітин у середовище 236 % вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  і 90 % -ів  $\text{K}^+$ .

## Література

1. Юрченко Т.Н., Козлова В.Ф., Скорняков Б.А. и др. Влияние кривопротекторов на биологические системы – Киев: Наук. думка, 1989. - 240с.
2. Грищенко В.И., Паращук Ю.С., Дахно Ф.В., Юрченко Г.Г. Кривобиология и проблема бесплодия – Киев: Наук. думка, 1990. - 136с.
3. Линник Т. П., Грищенко В. И., Артеменко А. Б., Терещенко А. В. Влияние осмотичности кривозащиты среды на сохранность спермиев петуха при кривоконсервировании // Проблемы кривобиологии. – 2000. – № 2. – С. 86-93.
4. Цуцаева А. А., Микулинский Ю. Е., Высеканцев И. П. и др. Холодовой стресс и биологические системы. – Киев: Наук. думка, 1991. - 176с.
5. Aalseth E.P., Saacke R.G. Morphological change of the acrosome on motile bovine spermatozoa due to storage at 4 °C // J. Reprod. Fert. – 1985. – Vol.74. – P. 473-478.
6. Cerolini S., Maldjian A., Pizzi F., Gliozzi T.M. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen // Reproduction. – 2001. – Vol.121. – P. 395-401.
7. Gamete physiology / ed. by Asch R.H., Balmaceda J.P., Johnston I. – USA: Norvell, 1990. – 354 p.
8. Keel B.A., Webster B.W., Roberts D.K. Effects of cryopreservation on the motility characteristics of human spermatozoa // J. Reprod. Fert. – 1987. – Vol. 81. – P. 213-220.
9. Kliesh S., Cooper T.G. Semen analysis: spermogram according to WHO criteria // Urologie A. – 2008. – Vol. 1548. – P. 1550-1554.
10. Mortimer Sh. T. Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa // Reproduction. – 2004. – Vol. 127. – P. 285-291.
11. Ren D., Navarro B., Perez G. et all A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility // Natute. – 2001. – Vol.413. – P. 603-609.
12. Watson P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen // Animal reproduction science. – 2000. – Vol. 60. – P. 481-492.

---

**СТАНДАРТИЗИРОВАННАЯ МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ И ПЕРЕМЕЩЕННОГО КОЛИЧЕСТВА Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> В СИСТЕМЕ "КЛЕТКА-СРЕДА"**

**Максимьюк Г. В., Максимьюк В. М.**

С целью объективного контроля за функциональным состоянием изолированных клеток (сперматозоиды) предлагаем разработанную и стандартизированную методику определения динамики концентрации и перемещенного количества (содержания) ионов макро- и микроэлементов в системе "клетка-среда" методом пламенной и/или атомноадсорбционной спектрофотометрии.

**Ключевые слова:** эякулят, спермальная плазма, сперматозоиды, кальций, калий, натрий, концентрация и содержание перемещённых ионов, пламенная фотометрия.

**THE STANDARDIZED METHOD OF DETERMINING THE CONCENTRATION AND NUMBER OF DISPLACED AND Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> IN THE "CELL-ENVIRONMENT" SYSTEM**

**Maksymjuk H. V., Maksymjuk V. M.**

For an objective control of the functional state of isolated cells (spermatozoa) we offer a developed and standardized method for determining the dynamics of concentration and the amount of displaced macro- and microions in the "cell-environment" system by flame and/or atom absorption spectrophotometry.

**Key words:** ejaculate, sperm plasma, spermatozoa, calcium, potassium, sodium, concentration and amount of displaced ions, flame photometry.

---