

СИСТЕМИ ТРАНСПОРТУВАННЯ Ca^{2+} У СПЕРМАТОЗОЇДАХ. БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ КАПАЦИТАЦІЇ ТА АКРОСОМНОЇ РЕАКЦІЇ

Н. С. КОЧЕШКОВА, З. Д. ВОРОБЕЦЬ

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, Україна;
e-mail: contact@mail.lviv.ua

В огляді систематизовано сучасні уявлення стосовно ролі макроелементів, передусім іонів Ca^{2+} , у фізико-хімічних та біохімічних процесах, що відбуваються у сперматозоїдах, забезпечуючи збереження їхньої біологічної повноцінності і запліднювальної здатності. Наведено дані щодо вмісту, розподілу іонів в еякуляті, їхньої ролі в реалізації біохімічних процесів у сперматозоїдах у нормі та при різних патологіях. Описано основні Ca^{2+} -транспортувальні системи, які ідентифіковано в мембранах сперматозоїдів чоловіків, і їхнє значення в активації сперми, здатності клітин до активного руху, підтримання клітинного гомеостазу тощо. Запропоновано узагальнені схеми біохімічних механізмів процесу капацитації та акросомної реакції.

Ключові слова: еякулят, сперматозоїди, іони кальцію, Ca^{2+} -транспортувальні системи, процес капацитації, акросомна реакція.

За інформацією ВООЗ наприкінці ХХ ст. кількість бездітних сімей у світі досягнула 15–18%, що становить майже 60–80 млн. подружніх пар [1, 2]. Несприятливі тенденції демографічних процесів тією чи іншою мірою охопили багато країн, в т.ч. Україну, і набули кризового характеру. Середній показник народжуваності в Україні не перевищує 1,1 на одну жінку (проти 2,15 необхідних для відтворення населення). Проблема безпліддя стосується 10–15% сімей в Україні, що становить близько 1 млн. подружніх пар [3, 4]. Серед населення репродуктивного віку, згідно з офіційними статистичними даними, безплідними є 3,2% осіб, причому 0,3% припадає на частку чоловічого фактора [5]. В середньому в 40–50% випадків причиною бездітних шлюбів є порушення репродуктивної функції у чоловіків [29].

Порушення функцій репродуктивних органів та процесу сперматогенезу призводить до зниження якісних та кількісних показників сперми: концентрації, рухливості і морфології сперматозоїдів, порушення процесу капацитації, акросомної реакції, утворення антиспермальних антитіл та розвитку різних патологічних станів [6–17]. Тому на сьогодні актуально залишається проблема вивчення біохімічних закономірностей виникнення зазначених порушень, зокрема на іонному, молекулярному, мембранному та клітинному рівнях. Такі дані конче необхідні для розроблення нових підходів до профілактики та ефективного лі-

кування патологій чоловічої репродуктивної системи.

Формування сперматозоїдів відбувається в сім'яниках, а дозрівання їх – під впливом секретів придаткових статевих залоз (епідидимісу, передміхурової залози, сім'яних міхурців, бульбоуретральних залоз тощо). Необхідною умовою утворення функціонально повноцінних сперматозоїдів є висока локальна концентрація тестостерону, а також знижена на 2 °С відносно температури тіла температура яєчок [18–23]. У зрілому нормальному сперматозоїді є голівка, шийка, тіло та хвіст, що закінчується тонкою кінцевою ниткою. Загальна довжина сперматозоїда становить близько 50–60 мкм (голівка 5–6 мкм, шийка та тіло 6–7 мкм, хвіст 40–50 мкм) [6, 24]. Мікроскопічні дослідження сперми дозволяють оцінити її якісні характеристики [25–27], однак не завжди дають можливість поставити об'єктивний діагноз [28]. Тому проводять повний розгорнутий аналіз сперми (фізичних властивостей, хімічного складу тощо), який називається спермограмою, за якою оцінюють здатність чоловіка до запліднення. У 1992 р. ВООЗ затвердила стандартну методику аналізу сперми (табл. 1) [1, 2].

При вивченні результатів аналізу сперми прийнято використовувати таку термінологію [29]:

- нормозооспермія – показники сперми у нормі;
- олігозооспермія – концентрація сперматозоїдів < 20 млн/мл;

Таблиця 1. Спермограма здорового чоловіка

Показники	Значення
Об'єм еякуляту (сім'яної рідини)	≥ 2,0 мл
pH	7,2–7,8
Час розрідження еякуляту	20–60 хв
Кількість сперматозоїдів в 1 мл	≥ 60 млн./мл
Загальна кількість сперматозоїдів в еякуляті	≥ 40 млн.
Вміст активних рухливих сперматозоїдів (категорія А)	≥ 25%
Вміст рухливих сперматозоїдів (категорія А+В)	≥ 50%
Вміст патологічних форм	≤ 50%
Вміст живих сперматозоїдів	≥ 50%
Наявність клітин сперматогенезу	< 2%
Кількість лейкоцитів в еякуляті	< 1,0 млн./мл
Наявність еритроцитів	Немає
Наявність аглютинатів	Немає
Наявність агрегатів	Немає

- тератозооспермія – нормальних форм сперматозоїдів < 30% (за нормальних показників кількості та рухливих форм);

- астенозооспермія – рухливість сперматозоїдів категорії А < 25% або категорій А + В < 50% за нормальних показників кількості та морфологічних форм;

- олігоастенотератозооспермія – поєднання трьох варіантів патозооспермії;

- акіноспермія (акінезія) – повна відсутність рухливості живих сперматозоїдів у спермі та нездатність їх до запліднення;

- азооспермія – сперматозоїдів у спермі немає;

- аспермія – об'єм сперми – 0,0 мл.

Таким чином, для повного розуміння особливостей функціонування сперматозоїдів і причин виникнення та розвитку патологічних станів їх важливим є вивчення іонного складу сперми, механізмів трансмембранного перенесення іонів, біохімічних основ внутрішньоклітинних процесів тощо.

І. *Вміст, розподіл та роль макроелементів в еякуляті.* Перші науково обґрунтовані дані щодо вмісту мікро- та макроелементів у секретах статевих залоз самців пов'язують із роботами Ф. Мішера [30], проведених у 1970–1980 рр. Від того часу було запропоновано декілька різних полярних гіпотез стосовно ролі вмісту іонів у збереженні біологічної повноцінності сперматозоїдів. Неоднозначними та суперечливими на сьогодні залишаються результати опублікованих експериментальних робіт та їхня інтерпретація.

При вивченні змін концентрації іонів макроелементів у спермі (табл. 2) встановлено, що концентрація K^+ (140–150 мМ) у сперматозоїдах вища, ніж Na^+ (5–10 мМ) та Ca^{2+} (0,15–0,2 мкМ), але Na^+ у плазмі еякуляту (85–100 мМ) міститься більше, ніж K^+ (25–30 мМ) та Ca^{2+} (5–8 мМ) [31–34]. Крім того, між рівнем Ca^{2+} та Na^+ у спермі виявлено оборотну залежність, тоді як між Ca^{2+} і K^+ – пряму [35]. Очевидно, що неоднаковий рівень цих іонів у секретах придаткових залоз та самих клітинах впливає на інтенсивність біохімічних процесів у сперматозоїдах.

Щодо змін концентрації одновалентних катіонів у спермі відомо, що більша частина K^+ надходить у плазму із сім'яників, а Na^+ – із придаткових залоз. Це свідчить, що формування структури сперматозоїдів відбувається в багатому на іони калію середовищі, але здатність до руху вони набувають за високої концентрації натрію [36]. Установлено, що секреті сім'яників, окрім високого вмісту K^+ , містять

Таблиця 2. Розподіл катіонів між сперматозоїдами та плазмою еякуляту

Катіони	Концентрація катіонів	
	Сперматозоїди	Плазма
K^+	140–150 мМ	25–30 мМ
Na^+	5–10 мМ	85–100 мМ
Ca^{2+}	0,15–0,2 мкМ	5–8 мМ

сполуки натрію, фосфору, хлору тощо. Межі концентрацій їх досить широкі, а величина співвідношення між Na^+ і K^+ змінюється від 1 : 1 до 8 : 1 [37, 38].

Результати досліджень показують, що вміст Na^+ та K^+ в різних ділянках придатка сім'яників неоднаковий: у голівці – високий, у середній частині і хвості – низький [39]. Однією із причин цього феномена вважають різну інтенсивність абсорбції іонів у внутрішньому шарі вивідних проток придатка [14]. Це, ймовірно, спричинює появу клітин із різною рухливістю та неоднаковою стійкістю до змін умов середовища.

Вважають, що макро- і мікроелементи сприяють нейтралізації накопиченого на поверхні сперматозоїдів негативного заряду, посилюють фруктоліз, регулюють перебіг ферментативних процесів, стабілізують стан білково-ліпідних комплексів, захищають сперматозоїди від температурного шоку, визначають буферність середовищ, температуру кристалізації та впливають на багато інших функцій [35, 40–49].

Проте слід зазначити, що сучасні дослідження структурних, біохімічних та функціональних змін сперматозоїдів у природних і штучно створених умовах ще не дали однозначної відповіді стосовно значення Ca^{2+} у збереженні їхньої життєздатності та функціонування. Тому постає питання щодо необхідності детального системного вивчення ролі Ca^{2+} у сперматозоїдах, регуляції вмісту загального та іонізованого кальцію при різних фізіологічних і патологічних станах репродуктивної системи.

II. *Іони кальцію та функціональна активність сперматозоїдів.* Результати визначення внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію у сперматозоїдах чоловіків різних вікових груп (табл. 3) свідчать, що в еякулятах 21–35-річних осіб вона у 2–3 рази нижча, ніж у 36–45-річних і становить 0,15–0,25 та 0,85–1,03 мкМ відповідно. Це дає підставу стверджувати, що з віком $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у клітинах зростає, внаслідок чого знижується рухливість і запліднювальна здатність сперматозоїдів [38, 51].

У літературі наведено дані, які свідчать про кореляцію між певними патологіями

Таблиця 3. Концентрація іонів Ca^{2+} у сперматозоїдах чоловіків різних вікових груп

Вікова група	Концентрація іонів Ca^{2+} , мкМ
21–35 років	0,15–0,25
36–45 років	0,85–1,03

в організмі та вмістом іонів Ca у спермі. Наприклад, використовуючи метод swim-up, який ґрунтується на реалізації реакції аглютиніну *Pisum sativum* та кальцієвого іонофору A23187 із плазматичною мембраною сперматозоїдів, S. Dehninger et al. показали, що при тератозооспермії внутрішньоклітинний вміст Ca^{2+} зростає на фоні зниження рівня акросомної реакції і збереження неспецифічної відповіді клітин на дію кальцієвого іонофору [50]. Тому припускають, що популяція патологічних форм сперматозоїдів в еякулятах безплідних чоловіків має дефектний негеномний Р-спермальний рецептор і ненормальну трансдукційну мембранну систему [51].

В еякулятах здорових та хворих на астенозооспермію чоловіків, тобто з нормальною (>60%) та зниженою (<60%) рухливістю сперматозоїдів, вірогідних змін вмісту загального Ca не виявлено. Середнє значення катіона коливається в межах $3,48 \pm 0,12$ мМ. Однак зміни іонізованого Ca вірогідні і становлять $0,21 \pm 0,08$ та $0,09 \pm 0,04$ мМ відповідно (табл. 4) [52–54].

Сперматозоїди набувають здатності до руху, проходячи через придаток яєчка. Цей процес триває близько 2–6 діб. Середня швидкість їхнього руху – 3 мм/хв, максимальна – до 40 мм/хв (причому рухливість зберігається протягом 48 год) [6, 29]. У регуляції руху сперматозоїдів важлива роль належить концентрації cAMP, вмісту електролітів та зміщенню рН у клітині. Інтенсивність їхнього руху обумовлюється швидкістю реакцій фосфорилування в аксонемі осьових волокон хвоста. Швидкість перебігу реакції, опосередкованої cAMP та протеїнкіназою А, залежить від наявності іонів Ca та рівня рН у середовищі. При цьому Ca^{2+} безпосередньо впливає на активність фосфодіестерази і фосфатази. Така дія його

Таблиця 4. Вміст Ca^{2+} у спермі чоловіків із різною рухливістю сперматозоїдів

Рухливість сперматозоїдів	Вміст загального Ca, мМ	Вміст іонізованого Ca^{2+} , мкМ
Нормальна (>60%)	$3,48 \pm 0,12$	$0,21 \pm 0,08$
Знижена (<60%)		$0,09 \pm 0,04$

компенсується деактивацією аденілатциклази, що сприяє збереженню рухливості сперматозоїдів. Активація забезпечується лужним рН середовища, за якого у плазматичній мембрані відкриваються потенціалзалежні кальцієві канали [55–59].

Цікавим є погляд стосовно впливу іонів Са на ювенільні та зрілі форми чоловічих статевих клітин. Оскільки в епідидимальній спермі Ca^{2+} стимулює рух клітин, а в еякульованій інгібує, то реакцію сперматозоїдів на дію кальцію деякі автори вважають парадоксальним ефектом [60, 61].

На кафедрі медичної біології та генетики Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького проведено дослідження з метою виявлення кореляційних зв'язків між вмістом загального кальцію (у сперматозоїдах і плазмі) та показниками якості сперми (рис. 1, а, б, в) [34, 61, 62]. Між вмістом загального Са та рухливістю сперматозоїдів (рис. 1, а) було виявлено пряму залежність, а у плазмі еякуляту – обернену, що свідчить про надходження іонів кальцію у клітини із позаклітинного середовища. Також було показано, що зі зростанням кількості патологічних форм у сперматозоїдах накопичується кальцій, тоді як рівень його у плазмі еякуляту зменшується (рис. 1, б). Проте не встановлено кореляції між кількістю сперматозоїдів в 1 мл еякуляту та вмістом іонів Са як в сперматозоїдах, так і в плазмі еякуляту (рис. 1, в).

Унікальним зовнішньоклітинним депо Ca^{2+} у спермі є одномембранні везикули – простасоми (150–200 нм у діаметрі). Вони секретиуються залозами простати і містять значну кількість холестеролу, сфінгомеліну та кальцію. В разі нейтрального та слабокислого значень рН (5–7) простасоми розчиняються, вивільнюючи накопичені в них речовини, і впливають у такий спосіб на функції сперми. Було встановлено, що зростання $[\text{Ca}^{2+}]_i$ є пропорційним ступеню розчинності везикул [63].

Отже, залежно від стану репродуктивного здоров'я чоловіка і його сперми іони кальцію або накопичуються сперматозоїдами, або транспортуються у плазму. З огляду на це, важливим є питання ідентифікації Ca^{2+} -транспортувальних систем у мембранах сперматозоїдів, виявлення особливостей їхнього функціонування та з'ясування ролі перебігу різних біохімічних процесів у клітинах.

III. *Ca²⁺-транспортувальні системи і їхня роль в активації сперми.* У сперматозоїдах у нормі функціонують декілька систем транспортування іонів кальцію. Вектор їхнього руху

має напрям як за градієнтом електрохімічного потенціалу, так і проти нього.

Досить детально вивчено Ca^{2+} -транспортувальні системи статевих клітин у багатьох ссавців, однак не завжди ці дані можна адекватно переносити на репродуктивну систему людини, оскільки:

- у спермі людини спонтанна або індукована акросомна реакція притаманна 40% сперматозоїдів, у той час як у щурів – майже 80% [64–69];

- ефекти блокаторів Ca^{2+} -каналів на сперматогенез людини та досліджуваних тварин неоднакові. Так, наприклад, *in vivo* дигідропіридин та бензодіазепіни дозозалежно інгібують сперматогенез у гвінейських свиней [70, 71], але не чинять будь-якого впливу на сперматогенез у чоловіків [72]. Водночас, фенілалкіламіни, активуючи *in vivo* та *in vitro* акросомну реакцію у сперматозоїдах людини [72, 73], зумовлюють “викид” Ca^{2+} і пригнічення акросомної реакції у гвінейських свиней [69, 74].

У мембранах сперматозоїдів людини ідентифіковано декілька іон-транспортувальних систем [31, 51, 66, 75, 76]:

1. Ca^{2+} -канали:

- потенціалзалежні кальцієві канали (ПЗСаК), що відкриваються внаслідок деполяризації мембрани;

- рецепторзалежні кальцієві канали (РЗСаК), які активуються хімічними агоністами і поділяються на істинні та такі, що регулюються вторинними посередниками (канали IP_3 -рецепторів і cAMP/cGMP-залежні канали);

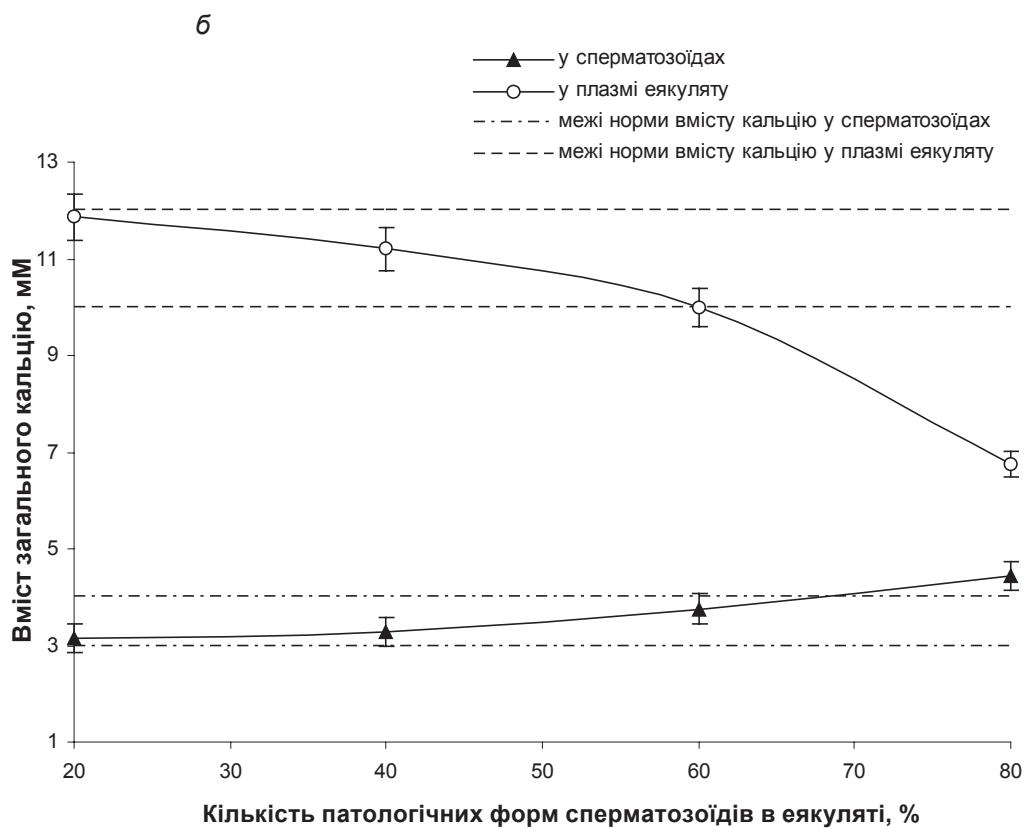
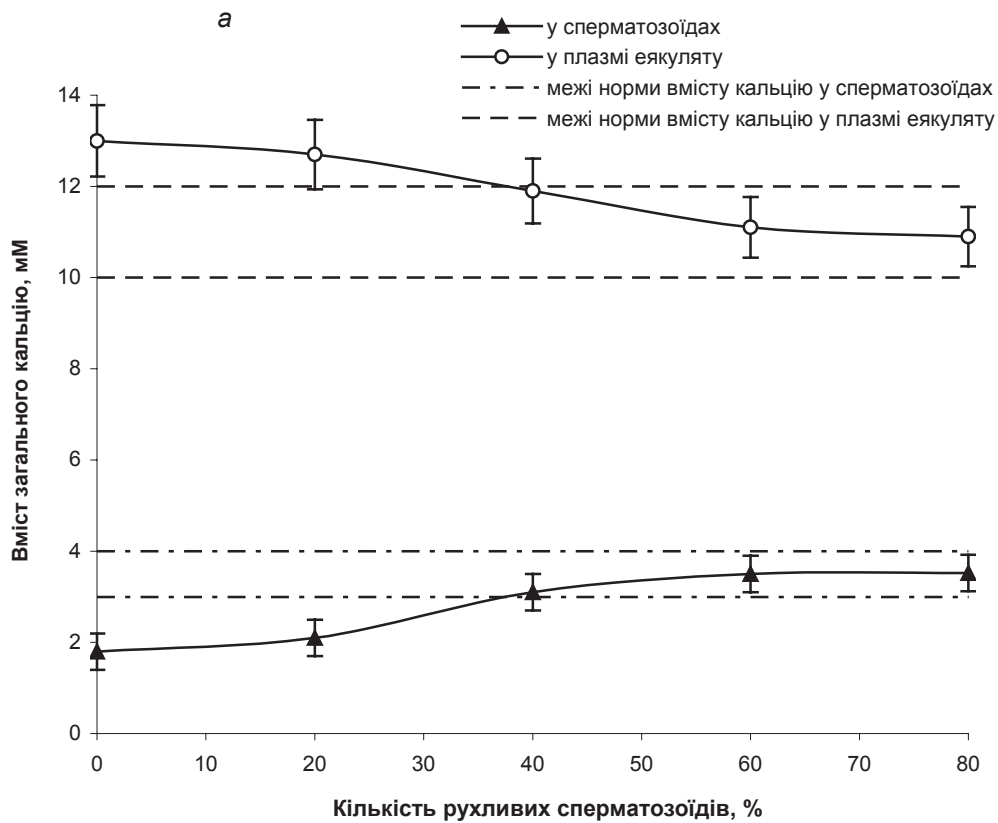
- депозалежні кальцієві канали (ДЗСаК), які активуються в разі виснаження внутрішньоклітинних запасів Ca^{2+} .

2. Антипортери, які здійснюють перенесення іонів без безпосередньої участі в цих процесах АТР ($n\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - і $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмінники);

3. F- і V-АТР-ази, що беруть участь у гідролізі, переносячи безпосередньо γ -фосфат АТР на молекулу води (H^+ -транспортувальні АТР-ази мітохондрій);

4. E_1 - E_2 -АТР-ази, які у процесі фосфорилування розщеплюють АТР (Na^+ , K^+ -АТР-ази і Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази плазматичних мембран та ендоплазматичного ретикулула).

Типовий ПЗСаК є гетеродимером, у складі якого містяться 4 субодиниці – $\alpha 1$, $\alpha 2$, β та δ (рис. 2). Субодиниці $\alpha 1$ і β експресуються з різних генів, а субодиниці $\alpha 2$ та δ синтезуються шляхом альтернативного сплайсингу одного праймера транскрипції [77, 78].



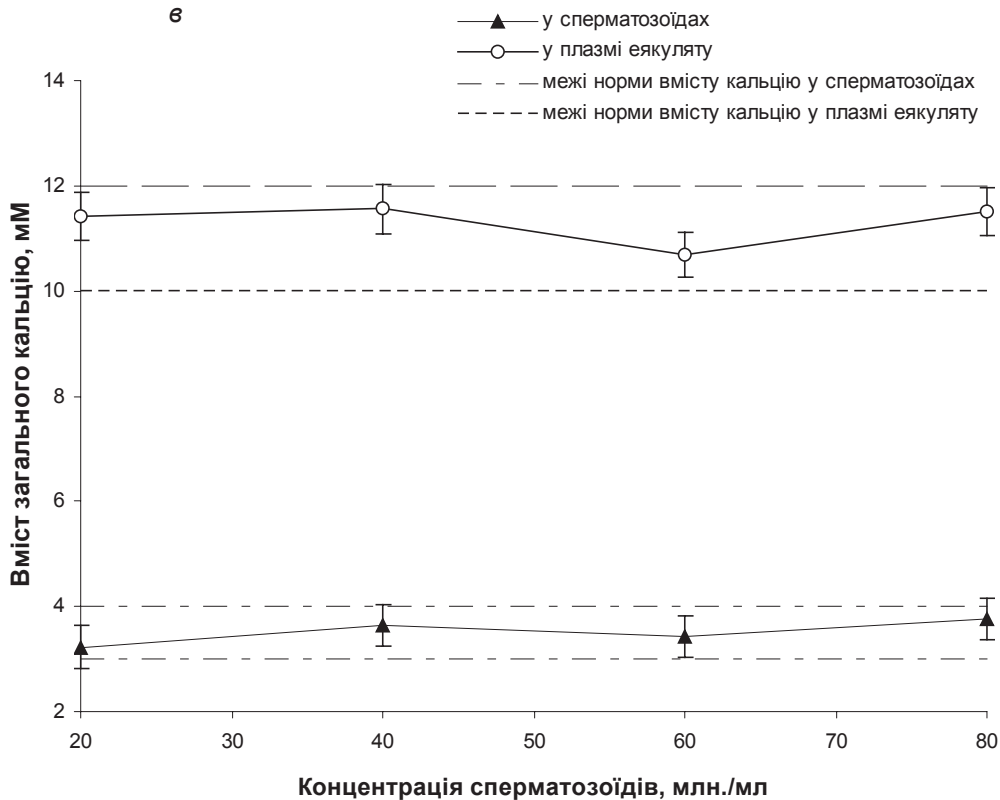


Рис. 1. Залежність між вмістом загального Са у сперматозоїдах та плазмі еякуляту і кількістю їхніх рухливих форм (а), патологічних форм (б) та концентрацією сперматозоїдів у спермі (в).

У сперматозоїдах виявлено канали L- і T-типів [51]. У субодиниці $\alpha 1$ L-типу ПЗСаК методом вестерн-блотингу ідентифіковано 2 типи білків з різною молекулярною масою [79, 80]:

1. 165–175 кДа (містяться також у соматичних клітинах),
2. 60 кДа (виявлено лише у фертильних чоловіків).

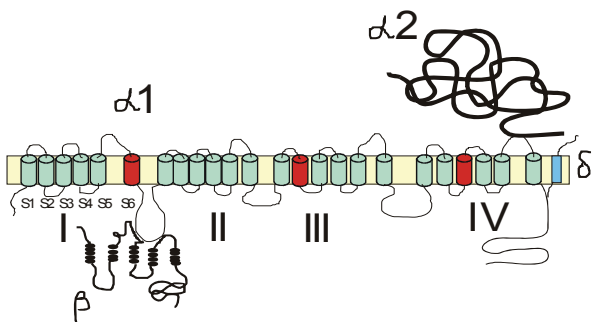


Рис. 2. Схема типового потенціалзалежного кальцієвого каналу сперматозоїдів [51]: $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, β - і δ -субодиниці ПЗСаК, I, II, III і IV – домени субодиниці $\alpha 1$; S1–S6 – трансмембранні ділянки домену.

Протеїни типу 2 мають манозний рецептор, втрата або блокування якого у 50% випадків призводить до стерильності сперми [67]. Тип білків 1 містить альтернативні сайти зв'язування блокторів цих каналів – I S6, III S2 та IV S3 [81, 82]. Деякі блокатори ПЗСаК сперматозоїдів, хоч і впливають на аналогічні структури соматичних клітин, однак не блокують їх. Тому дослідники схильні називати такі системи сперматозоїдів L-подібним типом ПЗСаК [83].

В електрофізіологічних експериментах на сперматогенних клітинах під час акросомної реакції зареєстровано T-тип потенціалзалежного кальцієвого струму [75]. Досі ведуться дискусії стосовно структури нативних T-каналів. Деякі автори вважають, що вони містять лише субодиницю $\alpha 1$, тоді як інші відносять їх до гетеродимерних [75, 76].

У дослідженнях ПЗСаК сперматозоїдів виявлено унікальний механізм функціонування (рис. 3), згідно з яким відкривання таких каналів регулюється лігандстимульованим фосфорилюванням тирозинів у сайтах I S6, III S2, яке інгібується *in vivo* та *in vitro* дигідропіридинами. Манозний рецептор відіграє в цих процесах ключову роль, зв'язуючи залиш-



Рис. 3. Механізм регулювання активності потенціалзалежних кальцієвих каналів сперматозоїдів та акросомної реакції.

ки манози із фосфорильованим тирозином ПЗСаК, що активує ZRK/hu9-тирозинкіназу голівки сперматозоїда — одного з регуляторних факторів акросомної реакції [84].

У статті J. Kirkman et al. змодельовано регуляторну роль Ca^{2+} in vitro [85]. Роботу кальцієвих каналів блокували верапамілом (концентрація 0,5–50 мкМ), після чого досліджували зміни в будові сперматозоїдів. Було встановлено, що за таких умов акросома, розміщена на передньому краї голівки, набухає, після чого голівка відокремлюється від тіла, а хвіст скручується кільцем. Через це сперматозоїди поступово втрачають властиву їм рухливість. Отже, підтверджується визначальна роль Ca^{2+} -каналів у збереженні та підтриманні нормальної морфології сперматозоїдів. Окрім того, блокування Ca^{2+} -каналів призводить до інгібування процесу капацитації, пригнічення виходу із клітин холестеролу та появи гідрокарбонатних залишків у сайтах зв'язування із блискучою оболонкою яйцеклітини (*Zona pellucida*) [75, 86].

Зважаючи на важливу роль іон-транспортувальних систем у розвитку патологічних станів, не втрачає актуальності розроблення нових підходів для тестування активності АТР-аз мембранних сперматозоїдів. Результати наших досліджень свідчать, що при використанні одного з ефективних неспецифічних інгібіторів АТР-гідролазних систем різних типів — еозину Y (2', 4', 5', 7'-тетрабромфлюоресцеїну) — загальна АТР-азна активність інтактних сперматозоїдів порівняно з контролем (тестується за відсутності інгібітора) ефективно знижується до рівня $61,2 \pm 6,2\%$ ($n = 6$).

Для з'ясування “латентної” АТР-гідролазної активності сперматозоїдів доцільно було пермеабілізувати їхні мембрани. Як детергент ми використовували сапонін, оскільки результати аналогічних експериментів з дигітоніном та тритоном X-100 не були однозначними. Максимальне збільшення АТР-азної активності порівняно з контролем (детергент в середовищі відсутній) спостерігається за дії 0,1% дигітоніну та 0,5% тритону X-100 ($121,5 \pm 26,6\%$ та $167,1 \pm 50,6\%$ відповідно; $n = 5$). Виявилось, що збільшення “латентної” еозинчутливої АТР-азної активності після оброблення суспензії сперматозоїдів сапоніном залежить від складу інкубаційного середовища. Дані спермограми показують, що при інкубації суспензії сперматозоїдів здорових чоловіків в зовнішньоклітинному середовищі (5 мМ Ca^{2+} , 5 мМ Mg^{2+} , 120 мМ Na^{+} і 30 мМ K^{+}), АТР-гідролазна активність порівняно з контролем (за відсутності детергенту) зростає у 2,0–2,5 раза (оптимальна концентрація сапоніну — 0,05%), а при інкубації у внутрішньоклітинному розчині (10 мкМ Ca^{2+} , 5 мМ Mg^{2+} , 30 мМ Na^{+} , 120 мМ K^{+}) — у 3–3,5 раза (концентрація детергенту — 0,4–0,5%). Значення еозин Y-чутливої АТР-азної активності при оптимальних концентраціях детергенту за інкубації в обох типах інкубаційних середовищ становили $7,3 \pm 1,3$ нмоль $\text{P}_i/\text{хв}$ на 1 мг білка. Це, вірогідно, свідчить, що вплив сапоніну на мембрани сперматозоїдів, який сукупно віддзеркалює процес пермеабілізації та можливу дію на АТР-гідролазні системи (як зовнішньо-, так і внутрішньоклітинної локалізації), залежить від іонного складу інкубаційного середовища.

У жіночих статевих шляхах сперматозоїди, зазнаючи змін, які називають капацитацією, набувають здатності до акросомної реакції, що забезпечує злиття з оолею. В них відбуваються тонкі зміни в характері руху джгутика (суперактивна рухливість). Так, наприклад, у кролів після капацитації гідродинамічна потужність сперміїв підвищується у 20 разів [95]. Біохімічні процеси під час капацитації і досі детально не з'ясовані. До факторів, які впливають на цей процес належать глікопротеїн із молекулярною масою 37 000 Да, високомолекулярний фактор, сіалопроїєїни, імуноглобуліни, компоненти комплементу сперматозоїдів, катехоламіни тощо [66]. Внаслідок капацитації сперматозоїди набувають здатності до акросомної реакції – морфологічних змін акросомного ковпачка, що є необхідною умовою для запліднення у ссавців [89]. Передня частина ковпачка починає набрякати, згодом зовнішня акросомна мембрана зливається з цитоплазматичною, що зумовлює вакуолізацію акросомного матриксу, наступне відокремлення ковпачка та вивільнення вмісту акросоми [87]. Ферменти акросомного матриксу полегшують проникнення сперматозоїдів крізь пояс клітин променистого вінця і блискучу оболонку яйцеклітини [92, 93].

Для того, щоб відбулися капацитація та акросомна реакція у визначений час і у визначеному місці, сперматозоїди мають зберігати життєздатність досить довго [75, 87]. Підтримання високої внутрішньоклітинної концентрації калію (близько 140 мМ) та низької натрію (5–10 мМ) і кальцію (0,15–0,2 мкМ) є основними умовами для виживання сперматозоїда [31]. Це пов'язано з участю мембранної Na^+ , K^+ -АТР-ази (викачує Na^+ із клітин та закачує в неї K^+) та Ca^{2+} -АТР-ази (викачує із клітин Ca^{2+}), функціонуванням $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - та $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмінників. На початкових етапах капацитації (рис. 4, узагальнено авторами на основі статей 31, 89, 95) у клітині активуються кисеньспецифічні реакції, що зумовлює накопичення в ній сАМР. Супероксид та пероксид водню, які є найважливішими посередниками цього процесу, ймовірно, контролюють всі реакції капацитації [66, 88, 95]. Оксид азоту (NO) також належить до важливих посередників капацитації. Він синтезується з L-аргініну NO-синтазами (NOS). У голівці сперматозоїдів, методом вестерн-блотингу виявлено нейронну nNOS та ендотеліальну eNOS з молекулярними масами 161 та 133 кДа відповідно [90]. NO також модулює рухливість і стійкість

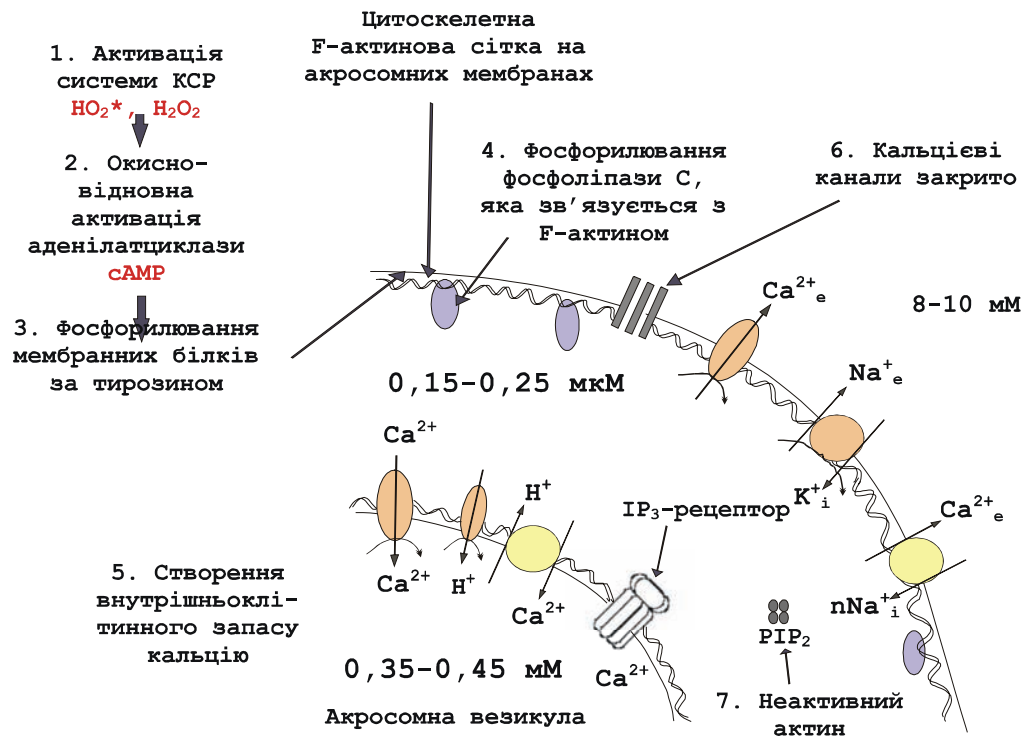


Рис.4. Біохімічний механізм процесу капацитації (узагальнено авторами на основі робіт [31, 89, 95]). КСР – кисеньспецифічні реакції, IP_3 – інозитол-1,4,5-трифосфат, PIP_2 – фосфатиділінозитол-4,5-біфосфат.

сперматозоїдів до змін умов у середовищі, регулює метаболізм і перебіг акросомної реакції у організмів багатьох видів, хоча механізм цього явища остаточно не розкрито [91]. Унаслідок каскаду реакцій цитоскелетна F-актинова сітка на акросомних мембранах зв'язується з фосфорильованою фосфоліпазою С, яка фосфорилує білки цитоплазматичної мембрани за тирозином, а внутрішньоклітинна концентрація кальцію досягає 0,35–0,45 мМ [88, 89].

Ca²⁺-транспортувальні білки капацизованого сперматозоїда є рецепторами глікопротеїнів та глікозаміногліканів яйцеклітини [75, 85, 86]. Активовані рецептори сприяють дифузії позаклітинного Ca²⁺ [76]. Масивне надходження кальцію у клітину інактивує Na⁺, K⁺-АТР-азу, що сприяє швидкому підвищенню внутрішньоклітинної концентрації натрію шляхом Na⁺/Ca²⁺-антипорту (рис. 5, узагальнено авторами на основі робіт [31, 85, 87]). Це спричинює вихід H⁺ (через Na⁺/H⁺-антипорт), і, як наслідок, – зростання внутрішньоклітинного рН [92–94]. Цитоплазматичний кальцій активно транспортується в акросому АТР-залежною тапсигаргінчутливою Ca²⁺-помпою, яка активується лише під час капацивативних та акросомних перетворень. При цьому акуму-

льований кальцій з акросоми вивільнюється кальцієвими каналами [87].

Мембранозв'язана фосфоліпаза С активується кальмодуліном кальцію, що надійшов із позаклітинного середовища. Фермент розщеплює фосфатидилінозитол-4,5-біфосфат на інозитол-1,4,5-трифосфат та 1,2-діацилгліцерол. У свою чергу, останній активує фосфоліпазу А₂, що має здатність активувати інші ферменти акросомного матриксу [85, 95, 96]. Інозитолтрифосфат при цьому стимулює вихід Ca²⁺ із внутрішньоклітинних депо. Це спричинює осциляцію кальцію в акросомному домені, якщо на капацизований сперматозоїд діє прогестерон [31, 85, 86].

У разі інкубації сперматозоїдів із донорами NO, наприклад нітропрусидом натрію, збільшується кількість клітин, в яких відбулася акросомна реакція на фоні одночасного підвищення внутрішньоклітинного рівня сGMP. Цікаво, що для перебігу індукованої нітропрусидом натрію акросомної реакції необхідна наявність зовнішньоклітинного Ca²⁺ [91, 97].

Однак унаслідок зменшення активності Ca²⁺-АТР-ази та/або Na⁺, K⁺-АТР-ази після поступового вичерпання АТР капацизований спер-

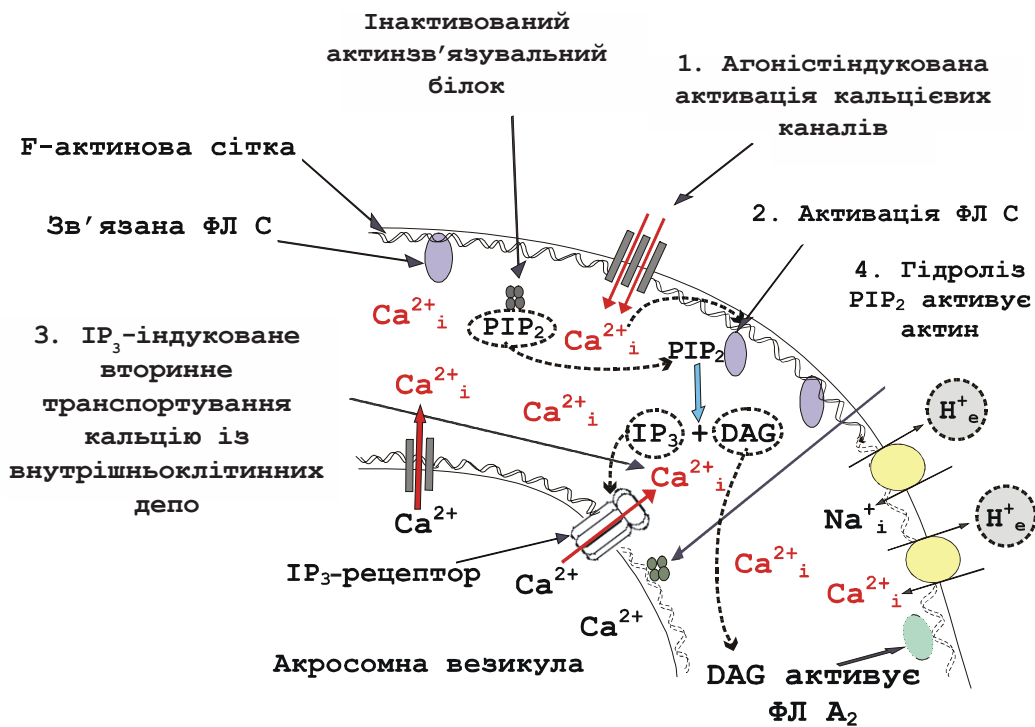


Рис. 5. Біохімічний механізм акросомної реакції (узагальнено авторами на основі робіт [31, 85, 87]): ФЛ С – фосфоліпаза С, ФЛ А₂ – фосфоліпаза А₂, IP₃ – інозитол-1,4,5-трифосфат, PIP₂ – фосфатидилінозитол-4,5-біфосфат, DAG – діацилгліцерол.

матозоїд може обумовлювати спонтанну акросомну реакцію (незалежно від яйцеклітини) [85].

Під час запліднення у ссавців сперма запускає в яйцеклітині серію осциляцій внутрішньоклітинного Ca^{2+} . Перше підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ відбувається під час запліднення сперматозоїдом яйцеклітини, а подальше – вже за участю її внутрішньоклітинних джерел [85, 93, 98]. Механізм цього запуску остаточно не з'ясовано, хоча опубліковано деякі припущення в цьому аспекті [99]:

- сперма діє як засіб передачі Ca^{2+} яйцеклітині під час розчинення мембранної оболонки;

- сперма діє на рецептори плазматичної мембрани, стимулюючи фосфоліпазу С яйцеклітини, яка генерує інозитолтрифосфат та подальший каскад реакцій;

- сперма стимулює вивільнення Ca^{2+} внаслідок введення білкового фактора сперматозоїда в яйцеклітину після руйнування мембрани гаметети.

Підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} є необхідною умовою активації яйцеклітини та нормального перебігу початкових етапів розвитку плода у всіх досліджених організмах. NO-синтаза, наявна у високих концентраціях у голівці сперматозоїда, активує сперму після акросомної реакції. Збільшення концентрації NO в яйцеклітині відбувається відразу після запліднення і, вірогідно, передують осциляції Ca^{2+} в заплідненій яйцеклітині [99].

Отже, дані літератури свідчать, що в мембранах сперматозоїдів локалізуються системи пасивного і активного транспортування Ca^{2+} , які створюють трансмембранний градієнт іонів, забезпечуючи активацію сперми та перебіг різних біохімічних процесів, зокрема капацитацію і акросомну реакцію.

Таким чином, на сьогодні проблема безпліддя, зокрема чоловічого, є актуальною для багатьох країн світу, в т.ч. і України. Саме тому особлива увага приділяється вивченню біохімічних закономірностей розвитку патологічних станів чоловічої репродуктивної системи на іонному, молекулярному, мембранному та клітинному рівнях. Дані літератури свідчать, що Ca^{2+} відіграє визначальну роль у таких життєвоважливих функціях сперматозоїдів, як здатність до активного руху, процесу капацитації, акросомної реакції, ініціації роз-

витку ембріона тощо. Встановлено, що концентрація K^+ у сперматозоїдах вища, ніж Na^+ та Ca^{2+} , тоді як у плазмі еякуляту міститься більше Na^+ , ніж K^+ та Ca^{2+} . З віком чоловіка у сперматозоїдах накопичуються іони Ca , через що знижується їхня рухливість та запліднювальна здатність. Виявлено зв'язок між якістю сперми, деякими патологічними станами організму та вмістом Ca^{2+} . При тератозооспермії внутрішньоклітинна концентрація останнього зростає, а при астенозооспермії – знижується. У мембранах сперматозоїдів ідентифіковано Ca^{2+} -транспортувальні системи активного і пасивного транспортування: Ca^{2+} -канали (потенціалзалежні, рецепторзалежні, депозалежні), іонні обмінники і Ca^{2+} -АТФ-ази. Встановлено механізм регуляції активності акросомної реакції, важливе значення в якому має функціонування потенціалзалежного кальцієвого каналу. Нами запропоновано узагальнені схеми біохімічних механізмів процесу капацитації та акросомної реакції, перебіг яких забезпечують системи транспортування іонів. Виявлено, що зростання концентрації вільного внутрішньоклітинного кальцію активує сперму в усіх досліджених організмах.

Однак, не зважаючи на численні дослідження в цьому аспекті немає повного розуміння ролі іонів Ca в забезпеченні життєздатності сперматозоїдів. Тому подальше вивчення Ca^{2+} -транспортувальних систем, їхніх властивостей та особливостей регуляції має важливе значення для з'ясування біохімічних процесів, на яких ґрунтується рухливість, акросомна реакція та запліднювальна здатність сперматозоїдів. На підставі аналізу даних літератури та власних експериментів можна дійти висновку, що подальші дослідження необхідно спрямовувати, передусім, на вивчення молекулярних та мембранних механізмів внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в нормі і при патології репродуктивної системи чоловіків. Це дасть можливість виявити закономірності розвитку таких патологічних станів та розробити нові ефективні стратегії їхньої профілактики та лікування.

Автори висловлюють подяку члену-кореспонденту НАН України, професору С. О. Костеріну за цінні рекомендації та зауваження під час обговорення результатів та написання статті.

СИСТЕМЫ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В СПЕРМАТОЗОИДАХ И БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПРОЦЕССА КАПАЦИТАЦИИ И АКРОСОМНОЙ РЕАКЦИИ

Н. С. Кочешкова, З. Д. Воробець

Львовский национальный медицинский
университет им. Данила Галицкого, Украина;
e-mail: contact@mail.lviv.ua

В обзоре систематизированы современные представления о роли макроэлементов, в частности ионов Са, в физико-химических и биохимических процессах сперматозоидов, что обеспечивает сохранение их биологической полноценности и оплодотворяющей способности. Обсуждаются данные относительно содержания и распределения ионов в эякуляте, их роли в реализации биохимических процессов в норме и при различных патологиях мужской репродуктивной системы. Рассматриваются Са²⁺-транспортные системы, идентифицированные в мембранах сперматозоидов, их роль в подвижности этих клеток, активации спермы, поддержании клеточного гомеостаза и др. Предложены обобщенные схемы биохимических механизмов процесса капацитации и акросомной реакции.

Ключевые слова: эякулят, сперматозоиды, ионы кальция, Са²⁺-транспортные системы, процесс капацитации, акросомная реакция.

CALCIUM IONS TRANSPORT SYSTEMS IN SPERMATOZOIDS AND BIOCHEMICAL MECHANISMS OF CAPACITATION AND ACROSOMIC REACTION

N. S. Kocheshkova, Z. D. Vorobets

Danylo Halytsky Lviv Medical University Львовський;
e-mail: contact@mail.lviv.ua

Summary

The paper systematizes modern ideas regarding the role of macroelements (including calcium ions) in physico-chemical, biochemical spermatozoid processes, that provides the preservation of their biological completeness and fertility. Information concerning ion content and ion distribution in semen of males of different age groups and in the ejaculate with different quality indicators is presented. The basic ion-transport systems

that are identified in spermatozoid membranes of males and their role in sperm activation, cell active movement ability, maintenance of cell homeostasis etc. are discussed. General schemes of biochemical mechanisms of capacitation process and acrosomic reaction are proposed.

Key words: ejaculate, spermatozooids, calcium ions, Са²⁺-transport systems, capacitation, acrosomic reaction.

1. World Health Organization: WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen Cervical Mucus Interaction / Cambridge: University press, 1992. — P. 3–27.
2. World Health Organization: WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen Cervical Mucus Interaction / Cambridge: University press, 1999. — P. 15.
3. Стан здоров'я населення України та діяльність медичної галузі. 2001 / Київ, 2002. — 281 с.
4. Національна програма “Репродуктивне здоров'я 2001–2005”. — К.: МОЗ України. 2000. — 33 с.
5. Статистичний щорічник України за 2004 р. / Під ред. О. Г. Осауленка. — К.: Техніка, 2005. — 592 с.
6. Лялько О. В., Прохоренко О. В., Козловський І. В. // Урологія. — 2002. — № 1. — С. 63–75.
7. Михайличенко В. В. Руководство по андрологии. — Л., 1990. — С. 297–335.
8. Саидова Р. А. // Рос. мед. журнал. — 2002. — 10, №16. — С. 687–695.
9. Єфремов Е. А., Дорофеев С. Д. // Там же. — 2003. — 11, № 24. — С. 1373–1341.
10. Vigue C., Vigue L., Huszar G. // J. of Andrology. — 1992. — 13, N 4. — P. 305–311.
11. Билич Г. Л., Божедомов В. А. Репродуктивная функция и сексуальность человека. — М.: Росбланкоиздат, 1998. — 242 с.
12. Божедомов В. А., Николаева М. А., Теодорович О. В. // Пробл. репрод. — 2003. — № 3. — С. 49–52.
13. Неймарк А. И., Алиев Р. Т. // Урология. — 2000. — № 3. — С. 34–37.
14. Crosignani P. G. // Hum. Reprod. Update. — 2004. — 10, N 4. — P. 295–307.
15. Корякин М. В., Акоюн А. С. // Пробл. репрод. — 2000. № 5. — С. 68–74.
16. Черных В. Б., Курило Л. Ф., Гоголевская И. К. и др. // Там же. — 2001. — № 3. — С. 58–62.
17. Калашникова Е. А. // Там же. — 2004. — № 4. — С. 55–60.
18. Плахтій П. Д. Статеве здоров'я юнаків та чоловіків. — Кам'янець-Подільський: Медобори, 2002. — 114 с.

19. *Jeulin C., Lewin L. M.* // Hum. Reprod. Update. – 1996. – **2**, N 2. – P. 87–102.
20. *Vitali G., Parente R., Melotti C.* // Drugs Exp. Clin. Res. – 1995. – **1**, N 4. – P. 157–159.
21. *Loumbakis P., Anezinis P., Evangelidou A. et al.* // Eur. Urol. – 1996. – **30**, N S2. – Abstract 954. – P. 255.
22. *Ostermeier G.C., Sargeant G.A., Yandell B.S. et al.* // J. of Andrology. – 2001. – **22**, N 4. – P. 595–603.
23. *Costa M., Canale D., Felicori M.D. et al.* // Andrologia. – 1994. – **26**, N 3. – P. 155–159.
24. *Mortimer D.* // J. of Andrology. – 2000. – **21**, N 3. – P. 357–366.
25. *Лучко Н. А.* // ПАГ. – 1997. – № 5. – С. 45–47.
26. *Брагина Е. Е., Абдумаликов Р. А., Курило Л. Ф., Шилейко Л. В.* // Пробл. репрод. – 2000. – № 6. – С. 62–71.
27. *Брагина Е. Е., Курило Л. Ф., Абдумаликов Р. А. и др.* // Там же. – 2004. – № 1. – С. 66–69.
28. *Владимирова Н. Ю., Наговицина Е. Б., Сятковская А. Л.* // Там же. – 2001. – № 3. – С. 54–58.
29. *Бойко Н. И., Борисенко Ю. А., Быстров А. А. и др.* Сексология и андрология. – К.: Абрис, 1997. – 880 с.
30. *Мишер Ф.* Труды по биохимии. – М.: Наука, 1985. – 527 с.
31. *Aitken R. J.* // Mol. Hum. Reprod. – 1997. – **3**, N 3. – P. 169–173.
32. *Brewis I. A., Morton I. E., Mohammad S. N. et al.* // J. of Andrology. – 2000. – **21**, N 2. – P. 238–249.
33. *Collin S., Sirard M.-A., Dufour M., Bailey J.* // Ibid. – N 6. – P. 938–943.
34. *Максим'юк Г. В., Бойко М. І., Воробець Д. З.* // Практ. медицина. – 2003. – **IX**, № 4. – С. 86–89.
35. *Crabo V., Gracham E.* // VIIth Int. Congr. Anim. Reprod. Munche. – 1972. – **2**. – P. 1639–1644.
36. *Ashisawa K., Wishart G. J.* // J. Reprod. Fertil. – 1992. – **95**. – P. 855–860.
37. *Лісовенко Г. С.* // Вісн. с.-г. науки. – 1969. – № 7. – С. 90–92.
38. *Немушкин В. В.* // Акушер. и гинекология. – 1970. – № 2. – С. 66–67.
39. *Наук В. А.* Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации. – Кишинев, 1991. – 198 с.
40. *Грищенко В. И., Черкашина И. В., Кучков И. Н. и др.* // Пробл. криобиол. – 2001. – № 3. – С. 27–28.
41. *Грищенко В. И., Чадаев В. С., Кучков И. Н. и др.* // Врачеб. практика. – 2001. – № 6. – С. 51–56.
42. *Грищенко В. И., Черкашина И. В., Кучков И. Н. и др.* // Пробл. криобиол. – 2001. – № 4. – С. 8–12.
43. *Гула Н. М., Тронько М. Д., Волков Г. Л., Маргітич В. М.* // Укр. біохім. журн. – 1993. – **65**, № 4. – С. 75–78.
44. *Гула Н. М., Маргітич В. М.* // Там само. – 1994. – **66**, № 1. – С. 3–10.
45. *Дунаевская А. В.* // Пробл. криобиол. – 2000. – № 3. – С. 40–50.
46. *Платов Е. М.* Криоконсервация спермы сельскохозяйственных животных. – Ленинград, 1988. – С. 161–195.
47. *Ford W. C. L.* // Hum. Reprod. Update. – 2004. – **10**, N 5. – P. 387–399.
48. *Baumber J., Ball B. A., Gravance C. G.* // J. of Andrology. – 2000. – **21**, N 6. – P. 895–902.
49. *Кузьменко В. А.* // Одеський мед. журн. – 2004. – **82**, № 2. – С. 21–23.
50. *Dehninger S., Blackmore P., Morshedi M. et al.* // Fertil. Steril. – 1994. – **61**, N 2. – P. 349–354.
51. *Benoff S.* // Front. Biosci. – 1998. – N 3. – P. D1220–D1240.
52. *Hong C. Y., Chiang B., Turner P.* // Lancet. – 1984. – **22**, N 29. – P. 1449–1451.
53. *Hong C.Y., Chiang B., Rinj W., Fong J.* // Br. J. Clin. Pharmacol. – 1985. – **19**. – P. 45–46.
54. *Paulsen H., Neisen H. P., Heinse J. et al.* // Andrologia. – 1980. – **12**, N 1. – P. 61–65.
55. *Tash J. S., Bracho G. E.* // J. of Andrology. – 1994. – **15**, N 1. P. 363–367.
56. *Aitken R. J.* // Ibid. – 2000. – **21**, N 4. – P. 491–496.
57. *Fraser L. R.* // J. Reprod. Fertil. – 1994. – **102**, N 1. – P. 107–116.
58. *Fraser L. R.* // Reprod. Fertil. Dev. – 1995. – N 7 (4). – P. 905–925.
59. *Kilic S., Sarica K., Yaman O. et al.* // Urol. Int. – 1996. – **56**, N 4. – P. 215–218.
60. *Laudat A., Lecourbe K., Pallulel M.* // Ann. Biol. Clin (Paris). – 1999. – **57**, N 1. – P. 51–56.
61. *Максим'юк Г. В.* Роль іонів кальцію, калію, натрію і транспортних АТФаз у збереженні біологічної повноцінності сперматозоїдів: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Львів, 2004. – 20 с.
62. *Зверева Г. В., Максим'юк Г. В.* // Вісн. аграр. науки. – 1997. – № 3. – С. 29–34.
63. *Palmerini C. A., Carlini E., Nicolucci A., Arienti G.* // Cell calcium. – 1999. – **285**. – P. 291–296.
64. *Benoff S., Rushbrook J. I., Hurley I. R. et al.* // Am. J. Reprod. Immunol. – 1995. – **34**. – P. 100–105.
65. *Jacob A., Hurley I., Mandel F. C. et al.* // Mol. Hum. Reprod. – 1998. – N 4. – P. 533–542.

66. *Wolf D. F.* // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 1989. – **20**. – P. 106–113.
67. *Benoff S., Hurley I. R., Mandel F. C. et al.* // *Mol. Hum. Reprod.* – 1997. – N 3. – P. 839–846.
68. *Hershlag A., Paine T., Scholl G. M. et al.* // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 1997. – **37**. – P. 291–299.
69. *Gwathmei T., Blackmore P. F., Mahony M. C.* // *J. of Andrology.* – 2000. – **21**, N 4. – P. 534–540.
70. *Juneja R., Gupta I., Wali A. et al.* // *Contraception.* – 1990. – **41**. – P. 179–187.
71. *Kishi K., Kanamori S., Mauyama T. et al.* // *J. Toxicol. Sci.* – 1995. – **20**. – P. 329–339.
72. *Benoff S., Cooper G. W., Hurley I. R. et al.* // *Fertil. Steril.* – 1994. – **62**. – P. 606–617.
73. *Jacob A., Hurley I. R., Mandel F. C., Benoff S.* // *Adv. Contracept. Dev. Syst.* – 1997. – N 13. – P. 223–238.
74. *Juneja R., Gupta I., Wali A. et al.* // *Contraception.* – 1990. – **41**. – P. 419–429.
75. *Florman H. M., First N. L.* // *Dev. Biol.* – 1998. – **128**. – P. 453–463.
76. *Belfeld P., Anderson R. A., Mack S. R. et al.* // *Fertil. Steril.* – 1994. – **62**. – P. 1255–1261.
77. *Williams M. E., Feldman A. F., McCue R. et al.* // *Neuron.* – 1992. – N 14. – P. 71–84.
78. *Kim H.-L., Kim H., Lee P. et al.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1992. – **89**. – P. 3251–3255.
79. *Leung A. T., Imagawa T., Campbell K. P.* // *J. Biol. Chem.* – 1987. – **262**. – P. 7943–7946.
80. *Sharp A. H., Campbell K. P.* // *J. Biol. Chem.* 1989. – **264**. – P. 2816–2825.
81. *Catterall W. A., Stressing J.* // *Trend. Pharmacol. Sci.* – 1992. – N 13. – P. 256–262.
82. *Doring F., Degtiar V. E., Grabner M. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 1995. – **270**. – P. 10540–10543.
83. *Florman H. M., Corron M. E., Kim T. D.-K., Babcock D. F.* // *Dev. Biol.* – 1992. – **152**. – P. 304–314.
84. *Benoff S., Hurley I. R., Mandel F. C. et al.* // *Mol. Hum. Reprod.* – 1997. – N 3. – P. 827–837.
85. *Kirkman-Brown J., Punt E. L., Barratt C.-L. R., Publicover S. J.* // *J. of Andrology.* – 2002. – **23**, N 3. – P. 306–315.
86. *Publicover S. J., Barrat C. L.* // *Hum. Reprod.* – 1999. – **285**. – P. 873–879.
87. *Dragileva E., Rubinshtein S., Breitbart H.* // *Biol. Hum. Reprod.* – 1999. – **61**. – P. 1226–1234.
88. *Leclerc P., Lamirande E., Gagnon C.* // *J. of Andrology.* – 1998. – **19**, N 4. – P. 434–443.
89. *Roldan E. R., Harrison R. A.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1990. – **172**. – P. 8–15.
90. *Meiser H., Schulz R.* // *Anat. Histol. Embriol.* – 2003. – **32**, N 2. – P. 321–325.
91. *Revelli A., Costamagna G., Moffa F. et al.* // *Biol. Reprod.* – 2001. – **64**, N 6. – P. 1708–1712.
92. *Breitbart H., Spungin B.* // *Mol. Hum. Reprod.* – 1997. – N 3. – P. 195–202.
93. *Benoff S.* // *Ibid.* – 1998. – N 4. – P. 453–471.
94. *Bulter D.M., Allen K.M., Garrett E.E. et al.* // *Dev. Biol.* – 1999. – **146**. – P. 453–464.
95. *Visconti P. E., Galantino-Homer H., Moore G. D. et al.* // *J. of Andrology.* – 1998. – **19**, N 2. – P. 242–248.
96. *Domringues L., Junes R., Fornes M. W.* // *Mol. Reprod. Dev.* – 1999. – **61**. – P. 297–302.
97. *Денисенко С. В.* // *Вісн. пробл. біол. та мед.* – 2002. Вип. 7–8. – С. 38–41.
98. *Swann K., Parrington J.* // *J. Exper. Zool.* – 1999. – **146**. – P. 267–275.
99. *Kuo R. C., Baxter G. T., Thompson S. H. et al.* // *Nature.* – 2000. – **406**, N 6796. – P. 633–636.

Отримано 25.01.2006