УДК 612.616:544.726:591.46

Г.В. МАКСИМЮК[1], З.Д. ВОРОБЕЦЬ[1], В.М. МАКСИМ'ЮК[2], Л.Г. ЛЕВИЦЬКА[2]
[1]Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького
[2]Інститут сільського господарства Карпатського регіону

Вільні та зв'язані іони солей лужних металів водних екстрактів тканин статевих органів

Сучасні способи визначення концентрації катіонних та аніонних аналітів у пробах біологічного матеріалу високочастотним титруванням розчинів за наявності фосфат-іонів [2], стимуляцією або інгібуванням активності ферментів [3, 4], розділенням вмісту проб іонселективними мембранами на складові та ідентифікацією іонів з утвореної на поверхні електрода плівки їх осаду [5] мають суттєві недоліки,

© Максимюк Г.В., Воробець З.Д., Максим'юк В.М. та ін., 2013

зумовлені складністю проведення численних аналізів, необхідністю придбання дорогих реактивів для аналітичної роботи, підготовки фахівців високої кваліфікації для інтерпретації результатів досліджень та обслуговування приладів. Тому рекомендований співпрацівникам біохімічних, біофізичних і біотехнологічних лабораторій спосіб визначення концентрації й співвідношень вільних і зв'язаних з легко-, важко- та нерозчинними сполуками іонів макро- та мікроелементів [6] має чимало переваг, а саме: використана здатність солей сильних і слабких електролітів дисоціювати у воді на катіони та аніони дає змогу ділити їх на окремі фракції без проведення відповідних біохімічних реакцій, створення особливих умов для регуляції інтенсивності перебігу біофізичних процесів, придбання високовартісних реактивів і приладів; поділ суми концентрацій ($\sum C_{1...4} = C_1 + C_2 + C_3 + C_4$) на вільні та зв'язані іони дає змогу визначати її абсолютні (мМ) та відносні (%) показники; отримати нові знання щодо механізмів формування гомеостазу [баланс, рівновага концентрації (вмісту)] іонів; розширити перспективи об'єктивної діагностики, оцінити, коригувати й прогнозувати функціональний стан (норма, патологія) клітин, тканин і органів людини, тварин, рослин; спектрофотометричний метод досліджень перемін концентрації та співвідношень іонів у пробах забезпечує низьку похибку визначених показників.

Мета публікації – запровадження до дослідної (наукової) та практичної роботи лабораторій методичних прийомів, які створюють сприятливі умови для вірогідної реєстрації показників норми концентрації й співвідношень іонів солей макро- і мікроелементів у фракціях водних екстрактів (ФВЕ) проб біологічного матеріалу та для об'єктивної оцінки їх перемін у системі "клітина–середовище" за дії екзо- і ендогенних чинників.

Статику й динаміку параметрів концетрації та співввідношень Ca^{2+}, K^+, Na^+ ілюструємо на прикладі ФВЕ тканин органів, функції яких пов'язані з регуляцією діяльності статевої системи бугаїв-плідників.

Матеріали та методи досліджень. Досліджували тканини статевих органів бугаїв чорно-рябої голштинської породи 12–18-місячного віку (n=5). Зразки тканин шкіри калитки, м'язовоеластичної та спеціальної піхвової оболонок, підіймача яєчка і препуція [захисна функція (n=25)]; сім'яного канатика та білкової оболонки [трофічна функція (n=10)]; яєчка, головки, хвоста придатка, міхурцевої і передміхурової залоз [генеративна функція (n=25)]; сім'япроводу, ампули сім'япроводу, м'язів, кореня, тіла й головки прутня [транспортна функція (n=30)] відбирали одразу ж після забою тварин.

Для досліджень брали 5,0 г свіжоотриманих тканин, порізаних скальпелем на дрібні шматочки. Подрібнені проби зважували аналітичними вагами і висушували до постійних значень їх маси у термостаті (сушильній шафі) за температури 105 °С. Висушені проби розтирали (гомогенізували) до дрібнодисперсного порошку. Від отриманої маси гомогенізованих тканин у центрифужну пробірку відбирали 0,5 г сухого порошку. До порошку доливали 4,5 см^3 бідистильованої води. Залиті водою проби ретельно перемішували скляною паличкою і одразу центрифугували 800 g за 5 хв. Відокремлену рідину (фракція № 1) використовували для визначення концентрації вільних іонів [1].

До екстрагованої маси порошку вдруге доливали 4,5 см^3 бідистильованої води, перемішували й витримували 24 год у термостаті за температури 18...20 °С. Проби поділяли на дві фази. Відокремлену методом центрифугування рідину (фракція № 2) використовували для визначення зв'язаних іонів з легкорозчинними комплексними сполуками неорганічних і органічних речовин [1].

Екстраговану масу порошку втретє заливали зазначеним об'ємом бідистильованої води, перемішували й за температури 18...20 °С витримували у термостаті 48 год. Дослідні проби знову поділяли на дві фази. У відокремленій рідині (фракція № 3) визначали концентрацію міцнозв'язаних іонів з важкорозчинними комплексними сполуками [1].

До екстрагованої маси порошку доливали 2,0 см^3 "царської горілки". Суміш кислот і проб ретельно перемішували. Витримували 24 години у витяжній шафі за температури 18...20 °С. Кислоту обережно випаровували у витяжній шафі на відкритому вогні газового пальника (пісочній бані). Залишки екстрагованих проб спалювали у муфельній печі за температури 450 °С. До отриманої золи доливали 4,5 см^3 бідистильованої води і методом полуменевої фотометрії за методикою [1] визначали концентрацію зв'язаних іонів з нерозчинними комплексними сполуками (фракція № 4).

Співвідношення абсолютної концентрації іонів позначили числовими виразами (ч.в.). Суму показників абсолютної концентрації (мМ) вільних і зв'язаних іонів ($\sum C^{1...4} = C_1 + C_2 + C_3 + C_4$) прийняли за 100%, кожної окремої фракції, – за x. Для ФВЕ № 1–4 складали відповідні пропорції та визначали відносні (%) показники концентрації Ca^{2+}, K^+, Na^+. Результати досліджень оцінювали методом варіаційної статистики [7] з використанням програми *Microsoft Excel*. Дані проведеного експерименту представили показниками середнього арифметичного ($M \pm m$), коефіцієнта варіації ($C_v \pm m$), лімітів відхилень (lim, min...max) та вірогідності різниці (p).

Результати досліджень та їх обговорення. Зведені у табл. 1 показники статики, динаміки й розподілу абсолютної концентрації Ca^{2+} свідчать: мінімальні (6,24±1,28 мМ) середні значення показників її суми ($\sum C_{1...4}$) властиві ФВЕ тканин, гомеостаз вільних і зв'язаних іонів яких регулює діяльність трофічної функції; максимальні (8,20±1,53 мМ) – захисної.

Виявили, що концентрація Ca^{2+} ФВЕ поступово знижується, а саме: $C_1 > C_2 > C_3$, але $C_3 \geq C_4$. У цьому ряду найвищою є концентрація вільних іонів (3,59...5,33 мМ). Ліміти концентрації зв'язаних іонів з легкорозчинними солями неорганічних і органічних сполук (1,61...1,74 мМ) в 2–3 рази менші, ніж вільних; зв'язаних з важкорозчинними (0,40...0,51 мМ) – в 3–4 рази менші, ніж зв'язаних з легкорозчинними. Проте ліміти концентрацій зв'язаного Ca^{2+} з важкорозчинними сполуками майже співпадають з нерозчинними Ca^{2+} з (0,41...0,65 мМ).

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

Широка межа коефіцієнта варіації ($C_{v\ \text{min-max}}$ = 7...65%) $\sum C_{1...4}$ Ca^{2+} ФВЕ призводить до того, що лише щодо концентрації Ca^{2+} тканин, які виконують захисну і трофічну функції (ФВЕ № 3), можна стверджувати про виявлену тенденцію до вірогідних змін ($p > 0,05$). За усіх інших варіантів вірогідність її різниці більша за 0,1...0,5 (табл. 1).

Таблиця 1

Абсолютні показники концентрації іонів, мМ

Іони	Функції	Стат. показники	ФВЕ, № 1–4				
			C_1	C_2	C_3	C_4	$\Sigma C_{1...4}$
Ca^{2+}	Захисна (n=25)	$M \pm m$	5,33±1,38>	1,72±0,44>	0,50±0,05<*	0,65±0,19	8,20±1,53
		$C_v \pm m$	57,72±18,25	57,08±18,05	23,79±7,52	65,18±20,61	51,63±13,16
		lim	3 – 11	1 – 3	0,4 – 0,7	0,3 – 1,4	5,5 – 13,7
	Трофічна (n=10)	$M \pm m$	3,59±0,98>	1,63±0,09>	0,40±0,02<*	0,62±0,23	6,24±1,28
		$C_v \pm m$	38,60±19,30	7,81±3,90	7,07±3,53	53,17±26,59	29,10±14,55
		lim	3 – 5	1,5 – 1,7	0,3 – 0,4	0,4 – 0,9	5,0 – 7,5
	Генеративна (n=25)	$M \pm m$	5,19±0,64>	1,74±0,28>	0,51±0,06>*	0,41±0,10	7,85±0,75
		$C_v \pm m$	27,68±8,75	36,61±11,58	26,27±8,31	53,43±16,90	21,43+6,78
		lim	3 – 7	1 – 3	0,3 – 0,7	0,2 – 0,8	5,2 – 9,4
	Транспортна (n=30)	$M \pm m$	5,20±0,80>	1,61±0,27>	0,41±0,03<	0,51±0,09	7,73±0,73
		$C_v \pm m$	37,64±10,86	41,44±11,96	18,90±5,46	44,07±12,72	23,41±6,76
		lim	3 – 9	1 – 3	0,3 – 0,5	0,3 – 0,9	6,5 – 11,2
K^+	Захисна (n=25)	$M \pm m$	28,76±6,55>*	16,00±3,47>	8,81±1,43<*	10,62±2,70	64,19±8,69*
		$C_v \pm m$	50,91±16,10	48,44±15,32	36,24±11,46	56,92±18,00	30,27±9,57
		lim	19 – 54	9 – 29	4 – 13	3 – 18	46 – 96
	Трофічна (n=10)	$M \pm m$	37,44±14,55>	17,38±4,41>	10,88±1,04>	4,97±2,40*	70,67±17,60
		$C_v \pm m$	54,97±27,49	35,91±17,96	13,52±6,76	68,36±34,18	35,22±17,61
		lim	23 – 52	13 – 22	10 – 12	3 – 7	53 – 88
	Генеративна (n=25)	$M \pm m$	65,58±14,95>*	25,91±5,33>	13,97±2,52>*	6,00±1,95	111,46±20,15*
		$C_v \pm m$	50,98±16,12	45,96±14,53	40,27±12,73	72,61±22,96	40,42±12,78
		lim	38 – 113	11 – 39	9 – 24	1 – 11	72 – 181
	Транспортна (n=30)	$M \pm m$	48,67±11,99>	21,31±3,15>	9,23±1,11<*	12,40±3,61*	91,61±14,02
		$C_v \pm m$	60,33±17,41	36,25±10,46	29,49±8,51	71,34±20,59	37,49±10,82
		lim	19 – 88	15 – 36	6 – 13	3 – 22	49 – 142

Закінчення табл. 1

Іони	Функції	Стат. показники	ФВЕ, № 1–4				
			C_1	C_2	C_3	C_4	$\sum C_{1...4}$
Na^+	Захисна (n=25)	$M \pm m$	103,77±11,37>**	50,70±9,83	25,02±2,48>*	18,76±5,12*	198,25±20,21**
		$C_v \pm m$	24,51±7,75	43,34±13,71	22,17±7,01	61,07±19,31	22,79±7,21
		lim	79 – 141	30 – 84	19 – 34	6 – 34	171 – 253
	Трофічна (n=10)	$M \pm m$	57,97±6,18>**	34,98±10,38>*	19,28±1,59>*	14,74±2,23*	126,97±15,93**
		$C_v \pm m$	15,08±7,54	41,98±20,99	11,70±5,85	21,39±10,70	17,74±8,87
		lim	52 – 64	25 – 45	18 – 21	12 – 17	111 – 143
	Генеративна (n=25)	$M \pm m$	143,56±14,86>***	55,29±7,01>*	22,48±3,58>	9,23±2,06*	230,56±15,87***
		$C_v \pm m$	23,14±7,31	28,34±8,96	35,65±11,27	49,78±15,74	35,49±11,22
		lim	91 – 179	33 – 74	15 – 36	3 – 14	190 – 282
	Транспортна (n=30)	$M \pm m$	100,62±11,43>*	50,25±6,77>	25,63±3,76<	26,72±9,94*	203,22±25,10**
		$C_v \pm m$	27,82±8,03	33,02±9,53	35,91±10,36	91,16±26,32	29,49±8,51
		lim	68 – 149	35 – 74	12 – 36	1 – 70	160 – 329

Примітки: 1. У ФВЕ № 1 тканин органів, які виконують захисну та генеративну функції, вірогідність різниці між показниками концентрації K^+ становить >0,05...<0,05*; Na^+ (захисна:генеративна, генеративна:транспортна) – <0,05*, (захисна:трофічна, трофічна:транспортна) – <0,01**, (трофічна:генеративна) – <0,001***. 2. У ФВЕ №2 Na^+ (трофічна:генеративна) – >0,05*. 3. У ФВЕ № 3 Ca^{2+} (захисна:трофічна, трофічна:генеративна) – >0,05*; K^+ (генеративна:транспортна) – >0,05*; Na^+ (захисна:трофічна) – >0,05*. 4. У ФВЕ №4 K^+ (трофічна:транспортна) – >0,05...<0,05*; Na^+ (захисна:генеративна, трофічна:генеративна, генеративна:транспортна) – >0,05...<0,05*. 5. $\sum C_{1...4}$ K^+ (трофічна:транспортна) – <0,05*; Na^+ (захисна:трофічна, трофічна:транспортна) – <0,02**, трофічна:генеративна) – <0,001***.

Мінімальний (64,19±8,69 мМ) середній показник $\sum C_{1...4}$ K^+ виявили у ФВЕ (№ 1...4) тканин, виділені секрети яких регулюють діяльність захисної; максимальний (111,46±20,15 мМ) – генеративної функцій. Однак у цьому зв'язку необхідно зазначити: поступове зниження концентрації Ca^{2+} в ряду $C_1>C_2>C_3>C_4$ призводить до того, що цей показник ФВЕ № 4 для тканин, які здійснюють захисну й транспортну функції, лише в 1,2–1,3 разу вищий, ніж у ФВЕ № 3. Різниця між мінімальною та максимальною концентраціями K^+ у ФВЕ № 1 становить 37, № 2–10, № 3–5, № 4–7 мМ, що дорівнює 82, 49, 48, 87% її середніх значень.

При цьому виявлено, що середня максимальна (65,58±14,95 мМ) концентрація вільного K^+ властива ФВЕ тканин яєчка, головки, хвоста придатка, міхурцевої та передміхурової залоз; мінімальна (28,76±6,55 мМ) – ФВЕ тканин шкіри калитки, м'язовоеластичної і спеціальної піхвової оболонок, підіймача яєчка та препуція. Але, якщо мінімальна й максимальна концентрація зв'язаного K^+ з легкорозчинними неорганічними та органічними сполуками (16,00...25,91 мМ) в 2–3 рази менша, ніж вільного, то зв'язаного з важкорозчинними (8,81...13,97 мМ) в 2 рази менша, ніж легкорозчинного.

За наявності широкої межі лімітів коефіцієнта варіації ($C_{v\ \text{min-max}}$ = 13 ...73%) показника $\sum C_{1...4}$ K^+ та показника концентрації вільних іонів тканин шкіри калитки, м'язовоеластичної та спеціальної піхвової оболонок, підіймача яєчка, препуція (захисна функція) та яєчка, головки і хвоста придатка, міхурцевої й передміхурової залоз (генеративна функція) виявили тенденцію до її вірогідної різниці (p>0,05...<0,05). Ця межа вірогідності даних експерименту характерна також для концентрації K^+ у ФВЕ № 3 тканин, гомеостаз яких регулює діяльність генеративної і транспортної, а ФВЕ № 4 – трофічної і транспортної функцій (табл. 2)

Визначені мінімальні середні показники $\sum C_{1...4}$ Na^+ (126,97±15,93 мМ) властиві тканинам, гомеостаз іонів яких регулює діяльність трофічної; максимальні (230,56±15,87 мМ) – генеративної функцій. Але, щодо розподілу концентрації вільних і зв'язаних іонів доцільно зауважити таке. Визначене значення для концентрації Ca^{2+} і K^+, його поступове зниження від ФВЕ № 1 до № 4 ($C_1>C_2>C_3>C_4$) властиве також концентрації Na^+. Однак якщо мінімальну середню концентрацію вільного Na^+ (57,97±6,18 мМ) визначили у фракціях тканин шкіри калитки, м'язовоеластичної та спеціальної піхвової оболонок, підіймача яєчка і препуція (захисна функція), то максимальну (143,56±14,86 мМ) – у ФВЕ тканин яєчка, головки і хвоста придатка, міхурцевої та передміхурової залоз (генеративна функція). При цьому ліміти (min... max) концентрації легкодисоційованих іонів (34,98...55,29 мМ) в 2–3 рази менші, ніж вільних; важкодисоційованих (19,28... 25,63мМ) – в 2–2,5 разу менші, ніж легкодисоційованих, а недисоційованих (9,23...26,72 мМ) в 1,0–2 рази менші, ніж важкодисоційованих.

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

Отже, приведені факти визначених змін свідчать, що вузька межа різниці показників абсолютної та відносної концентрації зв'язаного Ca^{2+}, K^+, Na^+ (ФВЕ № 2 і 3) виконує саме регульовану, захисну (буферну або компенсаторну) роль, що забезпечує для окремо взятих тканин репродуктивних органів стабільність балансу (рівновагу, гомеостаз) вільних іонів у системі "клітина-середовище".

Статистичний аналіз одержаних показників співвідношень концентрацій іонів різноіменних пар Na^+:Ca^{2+}, K^+:Ca^{2+} і Na^+:K^+ ФВЕ тканин, які створюють оптимальні умови для формування структури, життєздатності й запліднювальної здатності сперматозоїдів, свідчить, що норму діяльності захисної, трофічної, генеративної та транспортної функцій органів репродуктивної системи бугаїв регулює неоднаковий гомеостаз вільних і зв'язаних іонів (табл. 3).

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

При цьому співвідношення концентрації важкодисоційованих іонів у тканинах, які виконують захисну і транспортну та трофічну і генеративну функції в 1–3 рази більші, ніж вільних легко- і недисоційованих. Межа коливань коефіцієнта варіації визначених показників дуже широка ($C_{v\ \text{min-max}}$ = 5...88%). Це призводить до того, що лише щодо вільних і важкодисоційованих іонів тканин (ФВЕ № 1 і 3), які регулюють генеративну і транспортну функції, можна стверджувати про вірогідність тенденції до їх зв'язку (p>0,05).

У концентраційному ряду C_1...C_4 межа лімітів середніх співвідношень концентрації K^+:Ca^{2+} поступово зростає від вільних до зв'язаних іонів. Якщо мінімальні й максимальні показники співвідношень концентрації вільних іонів становлять 6...13:1; легкодисоційованих – 11...15:1; недисоційованих – 11...26:1, то важкодисоційованих – 19...28:1. Але зміну співвідношень K^+:Ca^{2+} у тканинах, гомеостаз іонів яких регулює діяльність захисної та транспортної функцій, виражає концентраційний ряд $C_1<C_2<C_3<C_4$, а трофічної і генеративної – $C_1<C_2<C_3>C_4$. При цьому співвідношення недисоційованих іонів тканин, які виконують захисну і транспортну функції, в 1–4 рази більші, ніж вільних, легко- і важкодисоційованих. Важкодисоційованих іонів у тканинах, які виконують трофічну і генеративну функції, у 2–3 рази більше, ніж вільних, легко- і недисиційованих. Межа коливань коефіцієнта їх варіації – широка ($C_{v\ \text{min-max}}$ = 30...103%). Тому можна стверджувати, що саме це є причиною виявленої тенденції (p>0,05...<0,05) лише до зв'язку концентрацій вільних іонів у тканинах органів, які виконують захисну й трофічну та захисну і генеративну функції.

На відміну від широких меж співвідношень концентрації вільних і зв'язаних іонів, а саме: Na^+:Ca^{2+} – 18...65:1, K^+:Ca^{2+} – 6...28:1, межа співвідношень Na^+:K^+ у ряду C_1...C_4 – дуже вузька (2...4:1). Проте, якщо мінімальні й максимальні показники співвідношень концентрації вільних і недисоційованих іонів становлять 2...4:1, то легко- і важкодисоційованих – 2...3:1. Зміну середніх співвідношень концентрації Na^+:K^+ у тканинах, гомеостаз іонів яких контролює діяльність захисної ($C_1>C_2>C_3<C_4$), транспортної ($C_1<C_2>C_3<C_4$), трофічної ($C_1<C_2>C_3<C_4$) і генеративної ($C_1<C_2>C_3<C_4$) функцій, виражено різними концентраційними рядами.

Співвідношення концентрацій вільного Na^+:K^+ у тканинах, які виконують захисну й транспортну функції, в 1–2 рази більші, ніж легко-, важко- і недисоційованого. Дещо вищі співвідношення концентрації недисоційованих іонів властиві тканинам, які контролюють трофічну функцію. Їх числові вирази удвічі більші, ніж вільних, легко- і важкодисоційованих.

Таблиця 2

Відносні показники концентрації іонів, %

Іони	Функції	Стат. показники	ФВЕ, № 1–4				
			C_1	C_2	C_3	C_4	$\Sigma C_{1...4}$
Ca^{2+}	Захисна (n=25)	$M \pm m$	65,00±4,78>	20,97±5,37>	6,10±1,13<	7,93±1,38	100,00
		$C_v \pm m$	16,95±5,36	54,17±17,13	36,60±11,57	39,50±12,49	
		lim	54 – 78	9 – 35	3 – 9	4 – 11	
	Трофічна (n=10)	$M \pm m$	56,66±4,03>	26,95±4,10>	6,76±1,71<	9,63±1,78	100,00
		$C_v \pm m$	10,07±5,04	21,55±10,77	35,77±17,89	26,11±13,06	
		lim	53 – 61	23 – 31	5 – 8	8 – 11	
	Генеративна (n=25)	$M \pm m$	65,65±3,58>	21,85±2,43>	6,98±1,52>	5,52±1,48	100,00
		$C_v \pm m$	12,18±3,85	24,88±7,87	48,84±15,44	60,16±19,02	
		lim	57 – 78	16 – 28	4 – 13	2 – 11	
	Транспортна (n=30)	$M \pm m$	66,23±5,77>	21,68±4,22>	5,44±0,58<	6,65±1,20	100,00
		$C_v \pm m$	21,34±6,16	47,74±13,78	26,18±7,56	44,10±12,73	
		lim	39 – 77	13 – 41	4 – 8	4 – 12	
K^+	Захисна (n=25)	$M \pm m$	43,21±3,51>	24,14±2,25>	14,02±2,16<	18,63±5,31*	100,00
		$C_v \pm m$	18,14±5,74	20,87±6,60	34,44±10,89	63,76±20,16	
		lim	36 – 57	17 – 30	8 – 20	3 – 35	
	Трофічна (n=10)	$M \pm m$	51,01±7,89>	24,56±0,13>	16,02±2,52>*	8,41±5,50	100,00
		$C_v \pm m$	21,87±10,94	0,75±0,37	22,25±11,12	92,49±46,24	
		lim	43 – 59	24 – 25	13 – 19	3 – 14	
	Генеративна (n=25)	$M \pm m$	56,96±3,22>	22,93±2,82>	13,20±1,76>	6,91±2,89*	100,00
		$C_v \pm m$	12,63±4,00	27,53±8,70	29,84±9,44	93,63±29,61	
		lim	51 – 67	15 – 32	7 – 17	1 – 15	
	Транспортна (n=30)	$M \pm m$	49,47±6,12>	24,39±2,68>	10,80±1,42<*	15,34±4,84	100,00
		$C_v \pm m$	30,31±8,75	26,95±7,78	32,28±9,32	77,43±22,35	
		lim	31 – 40	15 – 35	6 – 16	3 – 31	

Закінчення табл. 2

Іони	Функції	Стат. показники	ФВЕ, № 1–4				
			C_1	C_2	C_3	C_4	$\Sigma C_{1...4}$
Na^+	Захисна (n=25)	$M \pm m$	52,31±1,25>***	24,83±2,55>	12,81±0,93>*	10,05±2,71*	100,00
		$C_v \pm m$	5,37±1,70	22,95±7,26	16,33±5,16	60,24±19,05	
		lim	50 – 56	19 – 33	9 – 15	1 – 18	
	Трофічна (n=10)	$M \pm m$	45,77±0,88>**	26,95±4,80>	15,26±0,66>**	12,02±3,26*	100,00
		$C_v \pm m$	2,72±1,36	25,19±12,59	6,07±3,03	38,43±19,21	
		lim	45 – 47	22 – 32	15 – 16	9 – 15	
	Генеративна (n=25)	$M \pm m$	62,00±4,61>*	24,40±3,85>	9,73±1,3>**6	3,87±0,70*	100,00
		$C_v \pm m$	16,63±5,26	35,26±11,15	31,18±9,86	40,23±12,82	
		lim	48 – 75	16 – 39	7 – 15	1 – 5	
	Транспортна (n=30)	$M \pm m$	49,91±2,32>*	25,18±2,81>	12,91±1,81>	12,00±3,30*	100,00
		$C_v \pm m$	11,39±3,29	27,38±7,90	34,36±9,92	67,27±19,42	
		lim	43 – 59	18 – 34	6 – 19	1 – 21	

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

Таблиця 3

Співвідношення показників абсолютної концентрації іонів, ч. в.

Співвідношення	Функції	Стат. показники	ФВЕ, № 1–4				
			C_1	C_2	C_3	C_4	$\Sigma C_{1...4}$
$Na^+:Ca^{2+}$	Захисна (n=25)	$M \pm m$	22,92:1±3,90<	35,18:1±9,28<	52,02:1±6,63>	35,84:1±14,18	26.31:1±3,43
		$C_v \pm m$	38,04±12,03	58,97±18,65	28,48±9,01	88,47±27,98	29,14±9,53
		lim	9 – 31:1	24 – 72:1	35 – 67:1	8 – 90:1	14 – 34:1
	Трофічна (n=10)	$M \pm m$	17,95:1±6,62<	21,88:1±7,58<	48,13:1±1,58>	25,90:1±6,17	21,78:1±7,03
		$C_v \pm m$	52,18±26,09	48,99±24,50	4,64±2,32	33,71±16,85	45,65±22,82
		lim	11 – 25:1	4 – 29:1	46 – 50:1	20 – 32:1	15 – 29:1
	Генеративна (n=25)	$M \pm m$	28,63:1±3,38<	35,77:1±8,05<	43,69:1±3,30>	25,14:1±5,82	30,58:1±3,95
		$C_v \pm m$	26,38±8,34	50,30±15,91	16,89+5,34	51,79±16,38	28,88±9,13
		lim	22 – 41:1	18 – 65:1	32 – 53:1	9 – 41:1	24 – 46:1
	Транспортна (n=30)	$M \pm m$	20,86:1±2,78<	33,36:1±4,78<	65,31:1±10,82>	51,22:1±16,22	27,10:1±1,37
		$C_v \pm m$	32,68±9,43	35,09±10,13	40,60±11,72	77,56±22,39	12,38±3,57
		lim	12 – 31:1	20 – 49:1	31 – 92:1	3 – 103:1	21 – 31:1
$K^+:Ca^{2+}$	Захисна (n=25)	$M \pm m$	6,24:1±1,44<	10,98:1±2,51<	19,02:1±4,77<	22,56:1±9,17	8,33:1±0,97
		$C_v \pm m$	51,72±16,35	51,13±16,17	56,06±17,73	90,90±28,74	26,00±8,22
		lim	2 – 11:1	5 – 19:1	9 – 37:1	6 – 53:1	5 – 11
	Трофічна (n=10)	$M \pm m$	10,07:1±1,30<	10,54:1±2,12<	27,40:1±3,97>	10,96:1±7,96	11,21:1±0,51
		$C_v \pm m$	18,32±9,16	28,50±14,25	20,49±10,24	102,82±51,41	6,43±3,22
		lim	9 – 11:1	8 – 13:1	23 – 31:1	3 – 19:1	11 – 12:1
	Генеративна (n=25)	$M \pm m$	12,70:1±2,34<	15,30:1±2,88<	27,65:1±3,66>	16,25:1±5,79	14,19:1±1,90
		$C_v \pm m$	41,15±13,01	42,05±13,30	29,64±9,37	79,72±25,21	29,91±9,46
		lim	6 – 21:1	8 – 25:1	18 – 40:1	4 – 32±1	9 – 20:1
	Транспортна (n=30)	$M \pm m$	10,05:1±2,44<	15,16:1±3,28<	23,75:1±3,88<	26,01:1±7,36	12,46:1±2,17
		$C_v \pm m$	59,41±17,15	53,01±15,30	39,99±11,54	69,35±20,02	42,70±12,33
		lim	3 – 17:1	6 – 25:1	14 – 38:1	5 – 49:1	6 – 20:1

Закінчення табл. 3

Співвідношення	Функції	Стат. показники	ФВЕ, № 1–4				
			C_1	C_2	C_3	C_4	$\Sigma C_{1...4}$
Na^+:K^+	Захисна (n=25)	$M \pm m$	3,90:1±0,35>	3,33:1±0,44≥	3,06:1±0,54>	1,84:1±0,38	3,16:1±0,25
		$C_v \pm m$	19,99±6,32	29,65±9,38	38,18±12,07	45,60±14,42	17,64±5,58
		lim	2,6 – 4,5:1	2,0 – 4,6:1	1,8 – 4,5:1	0,9 – 3,1:1	2,6 – 3,9:1
	Трофічна (n=10)	$M \pm m$	1,90:1±0,90<	2,31:1±1,18>	1,80:1±0,32<	4,15:1±2,45	1,97:1±0,71
		$C_v \pm m$	66,99±33,49	72,39±36,20	25,14±12,57	83,49+41,74	51,20±25,60
		lim	1,0 – 2,8:1	1,1 – 3,5:1	1,5 – 2,1:1	1,7 – 6,6:1	1,3 – 2,7:1
	Генеративна (n=25)	$M \pm m$	2,60:1±0,58<	2,79:1±0,82>	1,76:1±0,34<	2,05±30,43	2,35:1±0,45
		$C_v \pm m$	49,58:1±15,68	65,42±20,69	43,28±13,69	46,56±14,72	43,26±13,68
		lim	1,4 – 4,4:1	1,0 – 5,2:1	0,8 – 2,9:1	0,9 – 3,4:1	1,3 – 3,5:1
	Транспортна (n=30)	$M \pm m$	3,08:1±0,93>	2,67:1±0,54<	3,04:1±0,60>	2,00:1±0,43	2,61:1±0,54
		$C_v \pm m$	74,16±21,41	49,45±14,28	48,04±13,87	52,70±15,21	50,42±14,55
		lim	1,0 – 6,7:1	1,0 – 4,1:1	1,0 – 5,0:1	0,3 – 3,2:1	1,4 – 4,6:1

Примітки: 1. * вірогідність різниці співвідношень показників абсолютної концентрації Na^+:Ca^{2+} у ФВЕ № 1 і № 3 тканин органів, які виконують генеративну і транспортну функції становить >0,05*. 2. K^+:Ca^{2+} у ФВЕ № 1 захисну і трофічну та захисну і генеративну – >0,05...<0,05*, за сумою концентрацій для захисної і трофічної, захисної і генеративної – <0,02– <0,02**, захисної і транспортної >0,05*. 3. Na^+:K^+ у ФВЕ № 1 захисну і трофічну та захисну і генеративну – >0,05...<0,05*, у ФВЕ № 3 захисну і трофічну та захисну і генеративну – >0,05...<0,05*, трофічну і транспортну та генеративну і транспортну – >0,05*.

Співвідношення легкодисоційованих іонів тканин, які відповідають за стан генеративної функції, в 1–2 рази більші, ніж вільних, важко- і недисоційованих. Проте, широка межа визначеного коефіцієнта варіації ($C_{v\ \text{min-max}}$ = 20...83%) співвідношень вільних іонів ФВЕ тканин, які координують діяльність захисної й трофічної та захисної і генеративної функцій, дає змогу стверджувати лише про наявність тенденції до їх зв'язку (p>0,05...<0,05).

Висновки. У фракціях водних екстрактів тканин статевих органів визначили неоднакові параметри суми ($\sum C_{1...4}$) абсолютної концентрації вільних, легко-, важко- і недисоційованих іонів солей лужних металів. Її ліміти для Ca^{2+} становлять: 6...8; K^+ – 64...111; Na^+ – 127...231 мМ. Мінімальна концентрація Ca^{2+} і Na^+ властива тканинам, які координують діяльність трофічної функції; максимальна K^+ і Na^+ – генеративної; максимальна Ca^{2+}, K^+ і Na^+ – транспортної, а мінімальна K^+ і максимальна Ca^{2+} – захисної.

Показники лімітів відносної концентрації вільного Ca^{2+} становлять: 57....66, легко- – 21...27, важко- – 5...7 і недисоційованого – 6...10; K^+, відповідно, 43...57; 23...25; 11...16; 7...17; Na^+ – 46...62, 24...27, 10–1,4...12% її визначеної суми ($\sum C_{1...4}$). У концентраційному ряду $C_1...C_4$ широкі ліміти співвідношень абсолютної концентрації вільного Na^+:Ca^{2+} становлять 18...29:1, легко- і недисоційованого – 22...36:1, важкодисоційованого – 44...65:1, вільного K^+:Ca^{2+} 6...13:1, легко- і недисоційованого – 11...26:1, важкодисоційованого – 19...28:1. Але співвідношення Na^+:K^+ – вузькі (2...4:1), а саме: вільного та недисоційованого 2...4:1, а легко- і важкодисоційованого – 2...3:1.

Визначені вузька (1...10), середня (11...20), широка (21...40%) межі різниці між показниками мінімальної та максимальної відносної концентрації легко-, важко- і недисоційованих іонів свідчить про те, що її неоднакові рівні виконують захисну бар'єрну (буферну або компенсаторну) роль, а це забезпечує стабільність балансу (рівновагу, гомеостаз) вільних іонів у системі "клітина–середовище".

Застосовані методичні прийоми і спосіб визначення концентрації й співвідношень вільних і зв'язаних іонів макро- та мікроелементів у пробах біологічного матеріалу рекомендуємо використовувати для діагностики, оцінки, корекції й прогнозування функціонального стану тканин органів людини, тварин, рослин та для організації компетентними органами ефективного контролю за станом екологічної безпеки продуктів рослинництва і тваринництва.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Максимюк Г.В.* Стандартизована методика визначення концентрації і переміщеної кількості Ca^{2+}, Na^+, K^+ у системі "клітина–середовище" / Г.В. Максимюк, В.М. Максим'юк / Фізика живого. – 2011. – Т. 19, № 1. – С. 10–15. 2. *Пат. 2030744* Российская Федерация, МПК G01N31/16. Способ определения кальция в присутствии фосфат-ионов / Власова Е.Г., Медведева Л.Н. [RU]; заявитель и патентообладатель Моск. химико-технол. ин-т им. Менделеева. [RU] – № 5015300/25; заявл. 20.12.1991; опубл. 10.03.1995. 3. *Пат. 2054674* Российская Федерация, МПК G01N27/42, G01N21/00. Способ определения концентрации ионов калия в биологическом материале / Берри М.Н. [GB], Таун М-Г. [GB], Крессе Д-Б. [DE], Геррманн У. [DE]; заявитель и патентообладатель Дзе Флиндерс Юниверсити оф Саут Аустрелиа [AU]; Берингер Маннгейм ГмбХ [DE]. – № 46131337/14; заявл. 02.04.1988; опубл. 20.02.1996. 4. *Пат. 2081411* Российская Федерация, МПК G01N33/48. Композиция для определения ионов натрия (варианты) /Берри М.Н. [GB], Таун М-Г. [GB], Крессе Д-Б. [DE], Геррманн У. [DE]; заявитель и патентообладатель Дзе Флиндерс Юниверсити оф Саут Аустрелиа [AU]; Берингер Маннгейм ГмбХ [DE]. – № 5010738/14; заявл. 03.12.1991; опубл. 10.06.1997. 5. *Пат. 2101696* Российская Федерация, МПК G01N27/42, G01N21/00. Способ определения концентрации ионов в жидкостях /Никитин А. К. [RU]; заявитель и патентообладатель Российский университет дружбы народов. [RU] – № 96116247/25; заявл. 06.08.1996; опубл. 10.01.1998. 6. *Пат. 69773* Україна, МПК G01N 21/00, G01N 21/41 (2006.01). Спосіб визначення концентрації вільних та зв'язаних іонів у водних екстрактах проб біологічного матеріалу / Максимюк Г.В. [UA], Воробець Д.З. [UA], Лаповець Л.Є. [UA] та ін.]; винахідник і власник Львів. нац. мед. ун-т ім. Данила

Галицького [UA]. – № u 2011 13162; заявл. 08.11.2011; опубл. 10.05.2012. 7. *Плохинский Н.А.* Биометрия. – М.: Изд-во МГУ, 1970. – 367 с.

Стаття надійшла до редколегії 15.05.13

СВОБОДНЫЕ И СВЯЗАННЫЕ ИОНЫ СОЛЕЙ ЩЕЛОЧНЫХ МЕТАЛЛОВ ВОДНЫХ ЭКСТРАКТОВ ТКАНЕЙ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ

А.В. МАКСИМЮК[1], З.Д. ВОРОБЕЦ[1], В.М. МАКСИМЮК[2], Л.Г. ЛЕВИЦКАЯ[2]

[1]Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого
[2]Институт сельского хозяйства Карпатского региона

Предлагаем разработанный, апробированный и запатентированный способ определения концентрации, распределения и соотношений свободных, легко-, трудно- и недиссоциированных ионов макро- и микроэлементов в водных фракциях проб биологического материала, который даёт возможность оценить изменения в системе “клетка–среда” при действии экзо- и эндогенных факторов при исследовании тканей половых органов, которые обеспечивают защитную, трофическую, генеративную и транспортную функции в организме.

Ключевые слова: ткани половых органов, водные экстракты, концентрация, соотношения, гомеостаз ионов.

FREE AND BOUND IONS OF ALKALI METALS SALTS IN WATER EXTRACTS OF GENITAL TISSUES

H. MAKSYMIUK[1], Z. VOROBETS[1],V. MAKSYMIUK[2], L. LEVYTSKA[2]

[1]Danylo Halytskyi Lviv National Medical University
[2]Institute of Agriculture of the Carpathian region

For graduate students, researchers and professional staff of biochemical, biophysical, biotech labs we offer developed, tested and patented method of determining the concentration, distribution and ratio of free, weakly and strongly undissociated ion salts of macro- and micronutrients in the fractions of water extract of biological material.

The widespread adoption in laboratories of the method for determination of the concentration of cationic and anionic analytes in samples of biological material requires a methodical approach that results in a mass analysis of experimental samples. The property of salts of strong and weak electrolytes to dissociate in the water into cations and anions allows to divide ions into factions of weak, strong and insoluble compounds of macro- and micronutrients. The recommended method has several advantages such as:

• ensures low error of determined absolute (mm) and relative (%) values of ions concentration;

• expands future capabilities for objective diagnosis of pathological processes: evaluation, correction and prediction of functional state of cells, tissues and organs of humans, animals and plants;

• allows to obtain new knowledge about the mechanisms of ion homeostasis.

The purpose of this publication is to introduce methods and techniques for scientific and practical laboratories that create an enabling environment for obtaining reliable concentration ratio values of salt ions of macro- and micronutrients in the fractions of water extract (FWE) of the biological material, allowing to objectively evaluate their changes between the cell and the environment under the effect of exogenous and endogenous factors.

We studied genital tissues of bulls of black and white Holstein breeds 12–18 months age. In these samples by means of flame photometry we determined the concentration of free and bound ions. The ratio of the absolute ion concentration (mM) is marked with numerical values (nv) and relative with percent (%).

The obtained results of concentration distribution and ratio of Ca^{2+}, K^{+}, Na^{+} in the reproductive organ tissues indicate that relatively narrow limit of the difference in absolute and relative indicators of bound ions performs self-regulated protective role, providing stability of free ions balance in the "spermatozoo – spermal plasma " system.

Unequal ratio of ion concentration of Na^{+}:Ca^{2+}, K^{+}:Ca^{2+} and Na^{+}:K^{+} pairs in FWE tissues that create optimal conditions for the formation of structure, sustainability and

fertile ability of sperm, control the activities of protective, trophic, generative and transport functions of bulls reproductive system and regulate the balance of the content of free and bound ions.Concentration ratio of the free Na^+ and K^+ ions in tissues that serve protective and transport functions is 1 – 2 times higher than the weak-, heavy- and undissociated ions concentration ratio. Somewhat higher ratio of undissociated ions is inherent in tissues that control trophic function. Their numerical values are 2 times higher than of free, weakly and heavily dissociated ions. Ratio of weakly dissociated ions in tissues that are responsible for the generative functions is 1–2 times higher than the free, heavily dissociated and undissociated. However, the wide range of the coefficient of variation ($C_{v\ \text{min-max}}$ = 20–83%) of free ions ratio in FWE tissues that coordinate the activities of protective and trophic, protective and generative functions allow us to speak only about the tendency for relation (p>0, 05...<0,05).

Key words: genital tissue, water extracts, calcium, potassium, sodium, concentration, concentration ratio, ion homeostasis.

УДК 617.764.1 : 576.342 : 577.352.465

А.Б. КОТЛЯРОВА, В.В. МАНЬКО
Львівський національний університет ім. Івана Франка

Вплив 2-АФБ на Ca^{2+}-помпу ендоплазматичного ретикулуму секреторних клітин сльозової залози

2-АФБ (2-аміноетоксидифенілборат) часто застосовують як інгібітор $IФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів [1, 14, 15, 17]. Щоправда, дані стосовно констант напівінгібування ($K_{0,5}$) цих каналів у різних тканинах відрізняються. Слід зазначити також, що інгібуюча дія 2-АФБ залежить від концентрації $IФ_3$, застосованого для активації $IФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів [14]. Максимальне вивільнення Ca^{2+} з мікросом мозочка спостерігали за дії $IФ_3$ у концентрації 10 мкмоль/л; у цьому випадку $K_{0,5}$ для 2-АФБ становила 1 ммоль/л [10]. $K_{0,5}$ ІФ3-чутливих Ca^{2+}-каналів пермеабілізованих клітин A_7r_5 для 2-АФБ становить 36 мкмоль/л і не залежить від концентрації $IФ_3$ [15].

Крім інгібування $IФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів, 2-АФБ діє на інші транспортувальні системи різних клітин [9–11]. Зокрема, 2-АФБ може інгібувати депокерований вхід Ca^{2+} у клітину [10], Ca^{2+}-помпу ендоплазматичного ретикулуму [1, 15] і стимулювати неспецифічний витік Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо [15], але $K_{0,5}$ у цьому випадку є суттєво вищою.

Мета нашої роботи – дослідити неоднозначність дії 2-АФБ на функціонування Ca^{2+}-помпи ендоплазматичного ретикулуму секреторних клітин зовнішньоорбітальної сльозової залози щура.

Матеріали та методи досліджень. В експерименті було використано нелінійних щурів масою 170...240 г, яких утримували в стаціонарних умовах віварію. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, та Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Після наркотизації хлороформом та декапітації тварин швидко виділяли зовнішньоорбітальну сльозову залозу (*glandula orbitalis externa*) та очищали її від сполучної тканини. Для ізолювання секреторних клітин використали модифікований нами метод [2, 5, 12,]. Інтактність плазматичної мембрани контролювали з використанням трипанового синього. Секреторні клітини пермеабілізували дигітоніном (50 мкг/мл

© Котлярова А.Б., Манько В.В., 2013