

УДК 612.616:636.7:57.086.13

ВПЛИВ ТІОТРИАЗОЛІНУ У СКЛАДІ СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ СПЕРМИ ПСІВ НА ЦІЛІСНІСТЬ ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН ТА ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ АКРОСОМ СПЕРМІЇВ ПІСЛЯ РОЗМОРОЖУВАННЯ

А. Р. Корбецький, М. М. Шаран
korbetskyu.andriy@inenbiol.com.ua

Інститут біології тварин НААН, вул. В. Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна

У статті наведено результати досліджень впливу різних концентрацій тіотриазоліну у складі середовища для кріоконсервування сперми псів (2, 4, 6, 8, 10 та 12 мг/мл) у порівнянні з середовищем без додавання тіотриазоліну. Вивчено зміни активності спермій, цілісності плазматичних мембран, збереженості акросом і виживаності спермій за різної концентрації тіотриазоліну в середовищі для заморожування сперми псів. Використали еякуляти дев'яти клінічно здорових статевозрілих псів різних порід. У результаті проведених досліджень встановлено, що тіотриазолін у концентрації 2 та 4 мг/мл не спричинив вірогідного зростання активності спермій після розморозжування порівняно з контролем. Встановлено, що збільшення концентрації тіотриазоліну до 6 мг/мл призвело до вірогідного зростання ($p < 0,05$) активності спермій псів після розморозжування на 7,6 % порівняно з контролем. Подальше збільшення концентрації тіотриазоліну (8, 10 та 12 мг/мл) у складі середовища для заморожування спермій спричинило зростання активності спермій псів після розморозжування з високою вірогідністю ($p < 0,001$) порівняно з контролем, однак між ними не спостерігалось вірогідної різниці, що вказує на відсутність позитивного впливу тіотриазоліну на активність спермій псів після розморозжування при збільшенні концентрації з 8 до 12 мг/мл. За збільшення концентрації тіотриазоліну у середовищі до 10 та 12 мг/мл спостерігалось зниження кількості спермій з неушкодженою плазматичною мембраною на 11,7 та 14,3 % ($p < 0,001$) відповідно. Вивчаючи показник виживаності спермій після розморозжування в середовищах з різною концентрацією тіотриазоліну, спостерігався позитивний вплив тіотриазоліну, вже починаючи з концентрації 4 мг/мл, де значення цього показника було на 6,9 % вище ($p < 0,05$) відносно контролю.

Ключові слова: СПЕРМА, ПЕС, КРІОКОНСЕРВУВАННЯ, ЦІЛІСНІСТЬ ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН, ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ АКРОСОМ, ТІОТРИАЗОЛІН

THE EFFECT OF THIOTRIAZOLIN IN DOG SEMEN FREEZING EXTENDER ON SPERM PLASMA MEMBRANE AND ACROSOME INTEGRITY AFTER THAWING

A. R. Korbetskyu, M. M. Sharan
korbetskyu.andriy@inenbiol.com.ua

Institute of Animal Biology NAAS, 38, st.Stus, Lviv, 79034, Ukraine

In this article are given the study results of addition of thiotriazolin to dog semen cryopreservation extender at different concentrations (2, 4, 6, 8, 10 and 12 mg/ml) compared with medium without addition of thiotriazolin. The changes of sperm progressive motility, longevity, plasma membrane and acrosome integrity of spermatozoa at different thiotriazolin concentrations added to the dog semen freezing extender. The ejaculates of nine healthy mature dogs of different breeds were used in the experiment. As a result of the study it was found that thiotriazolin at concentration of 2 and 4 mg/ml did not cause an increase in the progressive motility of spermatozoa after thawing compared to control. Established, that increasing the concentration of thiotriazolin to 6 mg/ml led to a significant increase ($p < 0.05$) the number of progressive spermatozoa after thawing by 7.6 % compared to control. Further increase in thiotriazolin concentration (8,

10 and 12 mg/ml) in sperm freezing extender caused increased number of spermatozoa with progressive movement after thawing with high probability ($p < 0.001$) compared to control, but between them we did not observe significant difference, which indicates no positive impact of thiotriazolin on sperm motility after thawing with increased concentrations from 8 to 12 mg/ml. Increased concentration of thiotriazolin between 10 and 12 mg/ml tended to improve the number of sperm with intact plasma membrane by 11.7 and 14.3 % ($p < 0.001$) respectively. Studying the rate of spermatozoa longevity after thawing frozen in the media with different thiotriazolin concentrations we observed positive effect of thiotriazolin starting from concentration of 4 mg/ml, where the value of this index was by 6.9 % higher ($p < 0.05$) compared to control.

Keywords: DOGS SPERM, CRYOPRESERVATION, PLASMA MEMBRANE INTEGRITY, ACROSOME PRESERVATION, THYOTRIAZOLIN

ВЛИЯНИЕ ТИОТРИАЗОЛИНА В СОСТАВЕ СРЕДЫ ДЛЯ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ КОБЕЛЕЙ НА ЦЕЛОСТНОСТЬ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН И АКРОСОМ СПЕРМИЕВ ПОСЛЕ РАЗМОРАЖИВАНИЯ

А. Р. Корбецький, М. М. Шаран
korbetskyi.andriy@inenbiol.com.ua

Институт биологии животных НААН, вул. В. Стуса, 38, Львів, 79034, Україна

В статье приведены результаты исследований влияния различных концентраций тиотриазолина в составе среды для криоконсервации спермы собак (2, 4, 6, 8, 10 и 12 мг/мл) по сравнению со средой без добавления тиотриазолина. Изучены изменения активности спермиев, целостности мембран, сохранности акросом и выживаемости спермиев при различной концентрации тиотриазолина в среде для замораживания спермы собак. Были использованы эякуляты девяти клинически здоровых половозрелых кобелей различных пород. В результате проведенных исследований было установлено, что тиотриазолин в концентрации 2 и 4 мг/мл не привел к росту активности спермиев после размораживания по сравнению с контролем. Установлено, что увеличение концентрации тиотриазолина до 6 мг/мл привело к достоверному росту ($p < 0,05$) активности спермиев кобелей после размораживания на 7,6 % относительно контроля. Дальнейшее увеличение концентрации тиотриазолина (8, 10 и 12 мг/мл) в составе среды для замораживания спермиев вызвало рост активности спермиев после размораживания с высокой вероятностью ($p < 0,001$) относительно контроля, однако между ними не наблюдалось достоверной разницы, что указывает на отсутствие положительного влияния тиотриазолина на активность спермиев кобелей после размораживания при увеличении концентрации с 8 до 12 мг/мл. При увеличении концентрации тиотриазолина в среде до 10 и 12 мг/мл наблюдалась тенденция к росту количества спермиев с неповрежденной плазматической мембраной на 11,7 и 14,3 % ($p < 0,001$) соответственно. Изучая показатель выживаемости спермиев после размораживания в средах с различной концентрацией тиотриазолина наблюдалось положительное влияние тиотриазолина уже начиная с концентрации 4 мг/мл, где значение этого показателя было на 6,9 % выше ($p < 0,05$) относительно контроля.

Ключевые слова: СПЕРМА, КОБЕЛЬ, КРИОКОНСЕРВАЦИЯ, ЦЕЛОСТНОСТЬ МЕМБРАН, СОХРАННОСТЬ АКРОСОМ, ТИОТРИАЗОЛИН

Кріоконсервування сперми ссавців, зокрема псів, супроводжується значним ушкодженням морфологічних структур спермій. Окрім механічного ушкодження, пов'язаного з внутрішньоклітинною кристалізацією та дією гіпертонічних розчинів під час заморожування, значне

місце займає порушення цілісності плазматичної мембрани в результаті холодового шоку, осмотичного стресу, дегідратації, кристалізації води та перекисного окиснення мембран ліпідів. У результаті впливу зазначених факторів знижується рухливість спермій і відповідно їх

запліднювальна здатність [1–4].

Якість замороженої сперми псів суттєво залежить від складу синтетичних середовищ, призначених забезпечити захист спермій від негативних чинників зовнішнього середовища. Для зниження негативного впливу заморожування на плазматичні мембрани спермій псів пропонують використовувати жовток курячого яйця у складі середовища для кріоконсервування, фосфоліпиди якого мають мембраностабілізуючий вплив, а також такі сульфовмісні сполуки, як глютамін, цистеїн та ін., які мають антиоксидантну дію [5–7]. Однак, досі не запропоновано речовини, яка б володіла низькою токсичністю і комплексною дією на спермії як мембранопротектор та антиоксидантз енерготропними властивостями.

Однією з таких речовин є тіотриазолін, що був синтезований у 1982 р. на кафедрі фармацевтичної хімії Запорізького медичного університету під керівництвом професора І. А. Мазура. Тіотриазолін широко використовується в медицині, зокрема в кардіології, гематології, неврології та хірургії завдяки широкому спектру фармакологічної активності, яка проявляється в антиоксидантній, протиішемій, мембраностабілізуючій, антиаритмічній, імуномодельючій і кардіопротекторній дії [8–10]. Однак, незважаючи на таке широке розповсюдження в клінічній медицині, не знайдено ніякої інформації щодо використання тіотриазоліну в складі розбавників сперми для зберігання та заморожування.

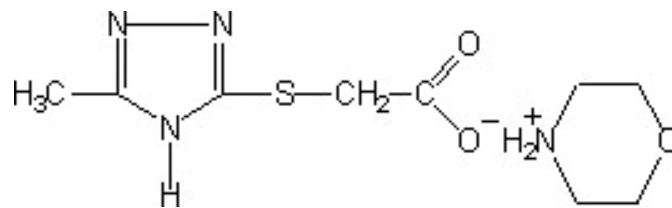


Рис. 1. Тіотриазолін(морфоліній 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат)

Відповідно до цього метою нашого дослідження було вивчити вплив тіотриазоліну у складі середовища для заморожування сперми псів на фізіологічні та морфобіохімічні показники якості спермій після розморожування.

Матеріали і методи

Для досліджень використовували дев'ять клінічно здорових статевозрілих псів віком 2–5 років, різних порід та живою масою, а саме: тварини змішаної породи (n=2), яких утримували у вольєрі Інституту біології тварин НААН та тварини приведені власниками для андрологічного обстеження, які були систематично задіяні у дослідженнях, порід — доберман пінчер (1), англійський бульдог (3), німецька вівчарка (2), кавказька вівчарка (1).

Усі маніпуляції з тваринами

проводили в дослідній клініці лабораторії фізіології та патології відтворення тварин Інституту біології тварин НААН. Сперму від псів відбирали за режимом два рази на тиждень. Перед взяттям сперми препуціальний отвір очищався ватними дисками, змоченими фізіологічним розчином від залишків сечі та інших видимих забруднень. Відбір сперми проводився мануально в ПВХ рукавиці, методом мастурбації в попередньо підігріті до температури 37 °C стерильні лійки та градуйовані пластикові пробірки об'ємом 15 мл [11]. Для досліджень використовували тільки другу фракцію еякуляту. Після взяття сперму переносили у водяний термостат (37 °C) для оцінки якості та подальших технологічних процедур.

Свіжоотримані еякуляти оцінювали за об'ємом (мл), рухливістю (%) та концентрацією

спермій. Для заморожування використовували еякуляти з концентрацією не менше 100 млн/мл, активністю не менше 70 % і з кількістю патологічних форм не більше 15 %. Заморожування сперми здійснювали в соломинках 0,5 мл (IMV, Франція) на програмному заморожувачі Cell Freezer R 204 (Planer, Великобританія). Після закінчення програми заморожування, соломинки переносили у рідкий азот (–196 °C). Деконсервування спермій проводили у водяному термостаті при 70 °C впродовж 8 с з подальшим перенесенням у водяний термостат з 37 °C.

Контролем були зразки сперми, заморожені в середовищі для кріоконсервування сперми псів TCYU [11]. Дослідні групи були сформовані зі зразків сперми псів, які заморожували у середовищах з додаванням тіотриазоліну у концентраціях: 2, 4, 6, 8, 10 та 12 мг/мл.

Активність спермій визначали методом фазово-контрастної мікроскопії на мікроскопі МБИ-15-2 за збільшення х 400 та виражали у відсотках спермій з прямолінійно-поступальним рухом від загальної кількості [12]. Цілісність плазматичних мембран (ЦПМ) визначали за зростанням активності маркерного ензиму лактатдегідрогенази (ЛДГ; КФ 1.1.1.27) в екстрацелюлярному середовищі (плазмі/середовищі) кінетичним методом за допомогою набору Liquick Cor-LDH® [13, 14]. Збереженість акросом (ЗА) спермій визначали за зростанням активності маркерного ферменту акрозину (КФ 3.4.21.10) у середовищі при збільшенні кількості спермій з ушкодженими акросомами. За порушення цілісності акросомальної мембрани акрозин разом з іншим вмістимим акросом виходить в оточуюче спермії середовище. Зростання активності акрозину в середовищі прямо пропорційне ступеню ушкодження акросом. Вимірювання проводили фотометрично кінетичним методом, фіксуючи зростання екстинкції Na-бензоїл-L-аргініну протягом 1 хв при довжині хвилі

259 нм [15, 16].

Збереженість акросом (ЗА) та цілісність плазматичних мембран (ЦПМ) вираховували за формулою:

$$ЗА\%, ЦПМ\% = 100 * \frac{макс - зразок}{макс}$$

де: *макс* — активність акрозину або ЛДГ у середовищі за примусового ушкодження акросом і плазматичних мембран у суспензії свіжоотриманих спермій з концентрацією 100×10^6 спермій/мл за допомогою Triton X-100, вважалось що ушкодилось 100 % спермій; *зразок* — активність акрозину або ЛДГ у дослідному зразку.

Виживаність спермій визначали за тривалістю інкубування в термостаті за температури 38 °C та виражали у хвилинах від початку інкубування. Кожних 30 хв оцінювали активність спермій і підраховували час до повного припинення руху.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою пакету програм Statistica 8 (StatSoft, США).

Результати й обговорення

У результаті проведених досліджень впливу різних концентрацій тіотриазоліну у складі середовища для кріоконсервування сперми псів встановлено, що концентрація тіотриазоліну 2 та 4 мг/мл вірогідно не вплинула на активність спермій після розморожування, та становила 52,5 та 57,3 % відповідно (табл. 1).

Однак збільшення концентрації тіотриазоліну до 6 мг/мл призвело до зростання активності спермій псів після розморожування на 7,6 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Подальше збільшення концентрації тіотриазоліну (8, 10 та 12 мг/мл) у складі середовища для заморожування спермій спричинило зростання активності спермій псів після розморожування з високою вірогідністю ($p < 0,001$) порівняно з контролем.

Таблиця 1

Активність та цілісність плазматичних мембран спермій за різних концентрацій тіотріазоліну у складі середовища для кріоконсервування спермій псів (n=9, M±m)

Концентрація тіотріазоліну	Активність спермій, %	Цілісність плазматичних мембран спермій, %
Контроль (0 мг/мл)	52,5±1,5	61,0±1,7
2 мг/мл	55,1±1,7	61,7±1,9
4 мг/мл	57,3±1,9	63,6±2,0
6 мг/мл	60,1±2,2*	66,7±2,3
8 мг/мл	64,3±2,0***	69,1±2,2*
10 мг/мл	63,2±2,3***	72,7±2,4**
12 мг/мл	64,1±2,1***	75,3±2,3***

Примітка: У цій та наступній таблицях різниця між даними, позначеними наступним знаком, є вірогідною порівняно з контролем: * — $p<0,05$, ** — $p<0,01$, *** — $p<0,001$

Однак між ними не спостерігалось вірогідної різниці — активність становила від 63,2 до 64,3 %, що вказує на відсутність подальшого позитивного впливу тіотріазоліну на життєздатність спермій псів після розморожування за збільшення концентрації з 8 до 12 мг/мл. Дещо схожу ситуацію спостерігали за вивчення впливу тіотріазоліну на кількість спермій з неушкодженою плазматичною мембраною — концентрація тіотріазоліну від 2 до 6 мг/мл у середовищі не спричинила вірогідних змін цього показника. Збільшення концентрації тіотріазоліну до 8 мг/мл спричинило зростання ($p<0,05$) кількості спермій з неушкодженою плазматичною мембраною на 8,1 % порівняно з контролем. Подальше збільшення концентрації тіотріазоліну у середовищі до 10 та 12 мг/мл призвело до зростання кількості спермій з неушкодженою плазматичною мембраною на 11,7 та 14,3 % ($p<0,001$) відповідно. Зростання кількості спермій з неушкодженою плазматичною мембраною в концентрації 8, 10 та 12 мг/мл вказує на мембранопротекторні властивості

тіотріазоліну та узгоджується з даними, що були отримані при вивченні впливу тіотріазоліну на гепатоцити та кардіоміоцити за токсичних та ішемічних станів організму людини [9, 10].

Вивченням кількості спермій з неушкодженою акросомою після розморожування не встановлено вірогідної різниці між усіма досліджуваними концентраціями тіотріазоліну в середовищі, хоча й відмічається певна тенденція до зростання за збільшенням його концентрації (табл. 2). Відсутність протекторного впливу тіотріазоліну на акросоми спермій псів після розморожування, очевидно, пов'язано з неоднаковою будовою плазматичних та акросомальних мембран спермій псів.

Вивчаючи показник виживаності спермій після розморожування в середовищах з різною концентрацією тіотріазоліну, спостерігався позитивний вплив тіотріазоліну, вже починаючи з концентрації 4 мг/мл, де значення цього показника було на 6,9 % ($p<0,05$) вище порівняно з контролем.

Збереженість акросом та виживаність спермій за різних концентрацій тіотріазоліну у складі середовища для кріоконсервування спермій псів (n=9, M±m)

Концентрація тіотріазоліну	Збереженість акросомспермій, %	Виживаність спермій, год.
Контроль (0 мг/мл)	56,0±1,2	7,2±0,14
2 мг/мл	57,1±1,1	7,4±0,18
4 мг/мл	57,6±1,2	7,7±0,15*
6 мг/мл	58,7±1,4	8,1±0,21**
8 мг/мл	59,1±1,3	9,2±0,24***
10 мг/мл	59,7±1,5	10,1±0,22***
12 мг/мл	60,2±1,6	10,3±0,23***

Подальше збільшення концентрації тіотріазоліну до 6, 8, 10 та 12 мг/мл призвело до зростання тривалості виживання спермій поза організмом відповідно на 12,5 (p<0,01), 27,8 (p<0,001), 40,3 (p<0,01) та 43,1 % (p<0,01) порівняно зі зразками, замороженими в контрольному середовищі без додавання тіотріазоліну. Такий вплив тіотріазоліну на виживаність спермій після розморожування, очевидно, пояснюється здатністю тіотріазоліну нормалізувати утилізацію запасів глюкози в клітині та активність глюкозо-6-фосфат дегідрогенази, підвищувати співвідношення НАД/НАДН та активність цитохромоксидази. Інтенсифікація тіотріазоліном окиснювального вуглеводного метаболізму сприяє підвищенню вмісту АТФ на фоні збільшеного фонду АДФ та зниження рівня АМФ [17, 18]. Зростання інтенсивності синтезу АТФ мітохондріями спричиняє збільшення активності спермій після розморожування та відповідно підвищується їх запліднювальна здатність.

Висновки

Додавання тіотріазоліну до середовища для кріоконсервування забезпечує вірогідно вищу активність спермій та цілісність їх плазматичних мембран у концентрації 8, 10 та 12 мг/мл порівняно з контрольними показниками. Тіотріазолін у всіх досліджуваних

концентраціях не забезпечив вірогідного зростання збереженості акросом спермій після деконсервування. Додавання тіотріазоліну до середовища для кріоконсервування забезпечило вірогідно вищу виживаність спермій псів після розморожування, починаючи з концентрації 4 мг/мл, що свідчить про комплексний протекторний вплив під час заморожування.

Перспективи подальших досліджень На основі проведених експериментів перспективними будуть дослідження з вивчення взаємозв'язку між заплідненістю сук і досліджувальних доз тіотріазоліну у середовищі для заморожування спермій псів.

1. Kharuta H. H., Sheremeta V. I. Vplyv biolohichno aktyvnoyi rehovyny na vyzhyvanist spermiyiv ta yikh zaplidnyuyuchu zdatnist [The impact of biologically active substances on sperm longevity and fertilizing capacity]. *Biolohiya tvaryn — The Animal Biology*, 2012, vol. 14, № 1–2, pp. 639–644 (in Ukrainian).

2. Witte T. S., Schafer-Somi S. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 2007, 102, p. 181–193.

3. Sherhyn N. P. *Byokhymyya spermu selskokhozyaystvennykh zhyvotnykh* [Biochemistry of domestic animal spermatozoa]. M., 1967. P. 239 (in Russian).

4. Heber U., Tyankova L., Santarius K. A. Stabilization and inactivation of biological

membranes during freezing in the presence of amino acids. *Biochem. Biophys. Acta*, 1971, 241, p. 578–592.

5. Nauk V. A. *Struktura i funktsiya spermyev selskokhoziaistvennykh zhyvotnykh pry kryokonservatsiyi* [Structure and function sperm domestic animals at cryopreservation]. Kyshynev, 1991. 198 p. (in Russian).

6. Ponglowhapan S., Esse'n-Gustavsson B., Linde-Forsberg C. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology*, 2004, 62, p. 1498–517.

7. Savchenkova L. V., Fylatov D. A., Belousova Y. P. Klyncheskaya farmakolohyya tiotriazolyna [Clinical pharmacology of thiotriazolin]. *Ukrayinskyi medychnyy almanakh — Ukrainian Medical Almanac*, 2008, vol. 11, № 3, p. 212–216 (in Ukrainian).

8. Belay Y. M. Vlyyanye novoho preparata tyotriazolyna na lypidnu obmenu perekysnoe okyslenye lypidov pry eksperymentalnom ateroskleroze [The effect of new drug – thiotriazolin on lipid metabolism and lipid peroxidation under experimental atherosclerosis]. *Zb. nauk. st. «Aktualni pytannya farmatsevtichnoyi ta medychnoyi nauky ta praktyky»* [Collection of Scientific Works «Current Issues of Pharmaceutical and Medical Science and Practice». Zaporizhzhya, 1997, vol. 1, p. 183–187 (in Russian).

9. Vyzyr V. A., Voloshyna Y. N., Voloshyn N. A., Mazur Y. A., Belenychev Y. F. Metabolicheskiye kardyoprotektory: farmakolohicheskiye svoystva y pryimenenye v klyncheskoy praktyke. Metodicheskiye rekomendatsyy [Metabolic cardioprotectors: pharmacological properties and clinical application. Methodic recommendation]. Zaporozhe, 2006. P. 36 (in Russian).

10. Vizir A. D., Hryhoryeva Z. Ye., Polivoda S. V. Novyy antyoksydant — tiotriazolin

u kompleksnomu likuvanni khvorykh na khronichnu ishemiyu sertsya [Newantioxidant – thiotriazolin complex treatment of patients with chronic heart ischemia]. *Liky — Medicine*, 1994, № 5–6, p. 80–84 (in Ukrainian).

11. Nothling J. O., Shuttleworth R. The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology*, 2005, 63, p. 1469–1480.

12. Korbetskyy A. R. Morfolohichna otsinka spermy metodom fazovo-kontrasnoyi mikroskopi [Morphological semen evaluation by phase-contrast microscopy]. *Naukovo-tekhnichnyy byuleten Instytutu biolohiyi tvarynta DNDKI veterynarnykh preparativ i kormovykh dobavok — Scientific and technical bulletin of the Institute of Animal Biology and State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives*, 2006, vol. 7, № 3, 4, pp. 236–240 (in Ukrainian).

13. Kuznetsov A. V., Gnaiger E. Laboratory Protocol Lactate Dehydrogenase. *Cytosolic marker enzyme Mitochondrial Physiology Network*, 2010, V. 08.18, p. 1–8.

14. Upreti G. C., Payne S. R., Duganzich D. M. et al. Enzyme leakage during cryopreservation of ram spermatozoa. *Animal reproduction science*, 1996, vol. 41, 1, p. 27–36.

15. Lax Y., Rubinstein S., Breitbart H. Acrosin activity assay for the evaluation of mammalian sperm acrosome reaction. *Methods Mol. Biol.*, 2004, 253, p. 135–140.

16. Kennedy W. P., Kaminski J. M., Vander Ven H. H. et al. A simple, clinical assay to evaluate the acrosin activity of human spermatozoa. *J. Androl.*, 1989, May-Jun, 10 (3), p. 221–31.

17. Belenychev Y. F., Hancheva O. V. *Patol.* 2004, T. 1, № 1, p. 15–26.

18. Byelenichev I. F., Stets V. R., Mazur I. A. Eksper. fiziol. ta biokhimiya. 2002, № 1, p. 7–1