



Биолог. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 616.681-018:5383

ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЭПИДИДИМИАЛЬНОЙ СПЕРМЫ КРЫС ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИХ ПОЛЕЙ

Г.В. СААКЯН, Г.Г. АРЦРУНИ, Т.Б. БАТИКЯН

НИИЦ ЕрГМУ им. М.Гераци, Ереван

Исследовано влияние электростатических полей на процесс созревания и функциональную активность эпидидимальных сперматозоидов крыс. Показано, что одночасовое влияние электростатического поля напряженностью 200 кВ/м активизирует сперматогенез и приводит к дополнительному выбросу в хвостик эпидидимиса сперматозоидов, у которых нарушена текучесть мембран. Дробное воздействие поля (6 сут, по 6 ч той же напряженности) оказывает повреждающее влияние на качество эпидидимальной спермы.

Ուսումնասիրվել է էլեկտրաստատիկ դաշտերի ազդեցությունը առնետների էպիդիդիմիալ սպերմատոզոիդների հասունացման և ֆունկցիոնալ ակտիվության վրա: Ցույց է տրվել, որ 200 կՎ/մ լարվածությամբ էլեկտրաստատիկ դաշտի մեկժամյա ազդեցությունը բերում է սպերմատոզոնեզի ակտիվացման և դեպի մակամորձու պոչիկ փոփոխված մեմբրանային մաձուցիկությամբ սպերմատոզոիդների լրացուցիչ արտանետման: Նույն պարամետրերով դաշտի կոտորակային ազդեցությամբ (6 օր, օրական 6 ժ) էպիդիդիմիսում նվազում է կենսունակ սպերմատոզոիդների կոնցենտրացիան:

The influence of electrostatic fields on maturation and functional activity of rat epididymal sperm was investigated. The data obtained show that one-hour influence of electrostatic field with 200kV/m tension leads to the activation of sperm emission to the epididymis with decreased membrane fluidity. The long-term influence (6 days, for 6-hour period) of the field with the same parameters has a damaging action on epididymal sperm membrane structure and decreases the concentration of viable sperm in epididymis.

Электростатические поля – сперматогенез – спермальная мембрана - соотношение холестерина/фосфолипид - резазуриновый зонд

Ранее нами было показано, что действие электростатических полей (ЭСП) выше фоновых напряженностей изменяет количественный и качественный состав липидной компоненты эритроцитарных мембран [2], структурно-функциональное состояние семенников и уровень гормонов, регулирующих сперматогенез [3, 4]. Биохимический состав и текучесть спермальных мембран меняются во время эпидидимального созревания.

Это обусловлено соотношением количеств мембранных фосфолипидов и холестерина. Так, плазматическая мембрана головки сперматозоида содержит большое количество холестерина, которое, как известно, регулирует текучесть липидного бислоя и повышение отрицательного заряда спермальной мембраны в процессе эпидидимиального созревания [14, 15]. Известно, что соотношение холестерина/фосфолипид (ХЛ/ФЛ) есть определенная величина для спермальных мембран данного вида и является важным параметром оценки функциональной активности сперматозоидов [5, 21]. Для созревших сперматозоидов крыс в норме ХЛ/ФЛ равняется единице [15]. Целью данной работы явилось исследование влияния ЭСП на функциональную активность эпидидимиальных сперматозоидов и оценка влияния поля на процесс созревания сперматозоидов.

Материал и методика. Объектом исследований служили мембраны эпидидимиальных сперматозоидов белых беспородных крыс массой 130-150 г, подвергшихся кратковременному (1 ч) и дробному (6 сут по 6 ч) воздействию ЭСП напряженностью 200 кВ/м. ЭСП создавали при помощи установки конденсаторного типа с контролируемыми параметрами поля [1].

Для каждой экспозиции и контрольных опытов использовали по 20 животных.

Животных забивали сразу после действия поля. Непосредственно после декапитации у всех исследуемых животных извлекали хвостик придатка семенника (эпидидимис).

Сперматозоиды выделяли по методике, предложенной Gustave et al. [13]. Измельченный эпидидимис инкубировали в растворе Рингер-Трис в соотношении 1:9 (мг/мл) при 4° в течение 30 мин. Крупные частицы ткани отделяли фильтрованием. Полученную суспензию центрифугировали при 130 g (10 мин при 4°) для отделения мелких частей эпидидимиальной ткани. Супернатант центрифугировали вторично при 650 g для осаждения неразрушенных сперматозоидов.

Спермальные мембраны выделяли по методу Luzio and Bailies [20]. Сперматозоиды гомогенизировали в 0,25 мМ сахарозе, забуференной 50 мМ Трис/НСI буфером, содержащим 1 мМ EDTA (pH 7,4) при 4° в течение 5 мин. Полученную суспензию центрифугировали при 1000 g (10 мин при 4°). Полученный мембраносодержащий супернатант хранили в глубокой заморозке. Белок определяли по методу Lowery et al. [19].

Фосфолипиды, экстрагированные по методу Bligh and Dyer [7], разделяли одномерной ТСХ в системе растворителей: петролейный эфир-диэтиловый эфир-муравьиная кислота (60:40:2, об/об). Оставшиеся на старте хроматографии фосфолипиды соскребали в колбочки Кьельдаля. Их суммарное количество определяли согласно методу Ernster et al. [10]. Определение холестерина проводили по методу Courchaine et al. [8].

Используя резазуриновый зонд, оценивали функциональную активность эпидидимиальных сперматозоидов. В основе резазуринового теста лежит спектрофотометрическая оценка сокращения количества резазурина за счет образования резазуфина. Показано, что оптическая плотность (ОП) прямо пропорциональна концентрации созревших сперматозоидов с интактной акросомой [12, 22]. Выделенные из придатка сперматозоиды разбавляли в 50 мкл растворе Рингер/Трис. Вводили 5 мл 0,1%-ного раствора резазурина. После одночасовой инкубации при температуре 48-50° измеряли ОП при 610 нм.

Каждое экспериментальное условие было воспроизведено в четырех различных опытах по 3 параллели для каждой точки.

Статистическую обработку данных проводили с помощью критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Как показывают полученные нами результаты (табл. 1), в мембранах сперматозоидов, выделенных из хвостика эпидидимиса интактных крыс, соотношение ХЛ/ФЛ равняется 0,95, что вполне коррелирует с литературными данными [15, 21]. После одночасового воздействия ЭСП количество холестерина в мембранах не меняется, а суммарное содержание ФЛ повышается втрое, что приводит к изменению соотношения ХЛ/ФЛ (1/3). Интересно, что дробное влияние поля приводит к обратному результату: на фоне неизменного количества суммарных ФЛ содержание холестерина снижается вдвое, приводя к соотношению ХЛ/ФЛ, равному 1/2.

Таблица 1. Количество суммарных фосфолипидов и холестерина в спермальных мембранах крыс в норме, при кратковременном и дробном воздействии ЭСП напряженностью 200 кВ/м, мг/мг белка

Воздействие ЭСП	Фосфолипиды	Холестерин	ХЛ/ФЛ
Контроль (0)	0.53 ± 0,02	0.50 ± 0,01	0.95
1-часовое	1.78 ± 0,1	0.49 ± 0,03	0.28
Дробное	0.47 ± 0,04	0.24 ± 0,01	0.51

Холестерин, являясь одним из важных компонентов спермальной мембраны, играет ключевую роль в архитектуре ее стабильности. Извлечение холестерина из мембраны приводит к дестабилизации спермального бислоя, что необходимо для оплодотворения яйцеклетки [6]. К тому же холестерин предотвращает слипание и кристаллизацию углеводородных цепей, ингибирует фазовые переходы, связанные с изменением температуры и таким образом предотвращает резкое уменьшение текучести мембран, которое в противном случае имело бы место при низкой температуре. Но, согласно литературным данным, созревание сперматозоидов и наличие в них интактной акросомы обусловлены также фосфолипидным компонентом мембраны. Так, известно, что во время эпидидимального созревания сперматозоиды из окружающей среды интегрируют фосфолипиды, которые прочно ассоциируются с индукцией их прогрессивной подвижности.

Все липидные компоненты спермальной мембраны участвуют в регуляции созревания спермы, сперматогенеза, акросомной реакции и в особенности мембранной проницаемости. Пероксидация спермальных липидов может привести к нарушению всех вышеперечисленных процессов и в экстремальном случае может полностью подавить процесс сперматогенеза [9, 11].

Очевидно, что изменение липидного состава спермальных мембран приведет к нарушениям всех функций сперматозоидов, в том числе подвижности, акросомной реакции и, следовательно, оплодотворяющей способности.

Согласно литературным данным, уменьшение соотношения ХЛ/ФЛ приводит к понижению мембранной анизотропности каудальной спермы [14]. Так как анизотропность и микровязкость мембраны являются обратно пропорциональными величинами, то соответственно понижение степени анизотропности приводит к повышению текучести мембраны [15]. Сопоставление этих фактов позволяет заключить, что понижение соотношения ХЛ/ФЛ приводит к увеличению микровязкости бислая.

Следовательно, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что одночасовое воздействие ЭСП стимулирует интенсивную интеграцию фосфолипидов в спермальную мембрану эпидидимальной спермы, не влияя на содержание холестерина, что приводит к повышению микровязкости мембранного бислая.

Исследованиедробного воздействия ЭСП на вышеперечисленные процессы, показало, что количество фосфолипидов не меняется, а холестерина уменьшается вдвое. Так как мембранный холестерин играет важнейшую роль во время оплодотворения яйцеклетки [17, 18], то можно полагать, что дробное воздействие приводит как к понижению текучести спермальной мембраны, так и к определенной потере оплодотворяющей способности спермы.

Проведенные нами исследования функциональной активности каудальной спермы после воздействия ЭСП при помощи резазуринового зонда показывают, что по сравнению с контролем одночасовое влияние приводит к достоверному повышению ОП на 8,57%, а дробное - к ее понижению на 9,71% (табл. 2).

Эти результаты свидетельствуют о том, что после одночасового влияния поля происходит активация выброса сперматозоидов в хвостик придатка, что вполне коррелирует с данными наших ранних гормональных и морфологических исследований, согласно которым одночасовое влияние поля приводит к активации сперматогенеза [3, 4].

Таблица 2. Результаты резазуринового теста эпидидимальной спермы в норме, при кратковременном и дробном воздействии ЭСП напряженностью 200 кВ/м

Воздействие ЭСП	Оптическая плотность
Контроль (0)	$1,75 \pm 0,006$
1-часовое	$1,90 \pm 0,012$
Дробное	$1,58 \pm 0,02$

Однако, как показано выше, одночасовое воздействие ЭСП приводит к изменению соотношения ХЛ/ФЛ, что свидетельствует о нарушении структуры и, соответственно, функционального состояния спермальной мембраны.

Снижение ОП при дробном воздействии ЭСП также подтверждается нашими ранними исследованиями, согласно которым при дробном влиянии нарушаются именно начальные стадии сперматогенеза, что приводит к уменьшению количества эпидидимальной спермы. Сопоставление значения ОП и ХЛ/ФЛ соотношения подтверждает повреждающее влияние длительного действия ЭСП также на конечную стадию сперматогенеза.

Результаты, приведенные в данной работе, и результаты наших ранних исследований свидетельствуют о том, что однократное влияние ЭСП напряженностью 200 кВ/м активизирует сперматогенез, приводит к дополнительному выбросу в хвостик эпидидимиса сперматозоидов и к нарушению текучести их мембран. Дробное воздействие поля тех же параметров оказывает повреждающее влияние как на начальные стадии сперматогенеза, так и на качество эпидидимальной спермы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Арируни Г.Г.* Камера для изучения действия ЭСП на мелкие лабораторные животные. Удост. на рац. предложение, 134, 1983.
2. *Арируни Г.Г.*, Глобус науки, 1 (1). - С. 33-37, 2001.
3. *Довлатян Р.А., Авакян Л.А., Арируни Г.Г.* Мед. наука Армении, XLIV, 2, с. 33-37, 2004.
4. *Саакян Г. В., Арируни Г.Г.* Биолог. ж. Армении, 58, 1-2, ст. 80-84, 2006.
5. *Alvarez J. G., Storey B. T.*, Mol Reprod Dev, 42, 334-46, 1995.
6. *Benoff S.*, Hum Reprod, 8, 2001-2008, 1993.
7. *Bligh and Dyer*, Canadian J. of Biochem. and Physiology, 37, 911-917, 1959.
8. *Courchaine A.J., Miller W.H., Stein D.B., Jr.* Clin.Chem., 5, p. 609, 1959.
9. *Dorota Sanocka, Maciej Kurpisz*, Reproductive Biology and Endocrinology, 2:12, 2004.
10. *Ernster I.R., Zeterstrom R., Lindberg O.*, Acta Chem. Scand., 4, p.942, 1950.
11. *Furimsky A. et al.*, BOR Papers in Press., 2004.
12. *Fuse H, Okumura M, Kazama T, Katayama T.* Andrologia, 25(3):153-7, 1993.
13. *Gustave A. Basone, Jerry L. Hedrich*, Biol. of Reprod., 66, 1203-1209, 2002.
14. *Haidl G., Opper C.* Human Reproduction, 12, 2720-2723, 1997.
15. *Hall J. C., Hadley J., Doman T.* Journal of Andrology, 12, Issue 1 76-87, 1991.
16. *Lalumiure G., Bleau G., Chapdelaine A., Roberts K. D.* Steroids, 27, 247-60, 1976.
17. *Langlais J., Roberts K. D.*, Gamete Res, 12, 183-224, 1985.
18. *Langlais J., Zollinger M., Plante L., Chapdelaine A., Bleau G., Roberts K. D.*, Proc Natl Acad Sci USA, 78, 7266-70, 1981.
19. *Lowery O. H., Rosebrough N. J., Farr R. H., Randal P. J.*, J. Biol. Chem., 193, 1, 265, 1951.
20. *Luzio, J. P. and Bailyes, E. M.*, Methods in Molecular Biology, 19, 295, 1993.
21. *Parks J. E., Hammerstedt R. H.*, Biol Reprod, 32, 653-68, 1985.
22. *Rahman NA, Kula K.* Int. J. Androl., 20, 1, 17-22, 1997.

Поступила 15.01.2008