



Биол. журн. Армении, 3 (62), 2010

ВЛИЯНИЕ ВНЕШНЕГО ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ НА АКРОСОМАЛЬНЫЙ СТАТУС СПЕРМАТОЗОИДОВ КРЫС

Г.В. СААКЯН, А.В. ЗИЛЬФЯН, Г.Г. АРЦРУНИ

ЕГМУ, лаборатория биохимических и биофизических исследований, НИЦ

Исследовано влияние электростатического поля (ЭСП) на количество и акросомальный статус эпидидимальной спермы крыс. Спектральными и иммуноморфологическими исследованиями показано, что одночасовое воздействие ЭСП напряженностью 200кВ/м приводит к повышению количества жизнеспособных сперматозоидов в хвостике эпидидимиса крыс, но одновременно снижает оплодотворяющую способность гамет в результате повреждения их акросомального аппарата.

Электростатическое поле – сперматозоид – акросома - FITC-PNA

Ուսումնասիրվել է 200 կՎ/մ լարվածությամբ էլեկտրաստատիկ դաշտի (ԷՍԴ) ազդեցությունը առնետների էպիդիդիմալ սպերմատոզոիդների քանակի և ակրոսոմային ստատուսի վրա: Սպեկտրալ և իմունամորֆոլոգիական հետազոտությունների արդյունքում պարզվել է, որ ԷՍԴ-ի մեկժամյա ազդեցությունից հետո առնետների էպիդիդիմիսի պոչիկում կենսունակ սպերմատոզոիդների քանակը աճում է, սակայն, միաժամանակ, վերջիններիս ակրոսոմային ապարատի վնասման հետևանքով, նվազում է գամետների բեղմնավորման ընդունակությունը:

Էլեկտրաստատիկ դաշտ - սպերմատոզոիդ - ակրոսոմ - FITC-PNA

The influence of 200 kV/m electrostatic field (ESF) on the quantity and acrosomal status of rat epididymal spermatozooids is investigated. As a result of spectral and immunomorphological investigations it is shown that the one-hour influence of ESF leads to the increase in the quantity of viable spermatozooids in rat cauda epididymis, but, simultaneously, the fertilization capacity of gametes due to disruption of their acrosome decreases.

Electrostatic field – spermatozoid – acrosome - FITC-PNA

Повышение мужского бесплодия в последние десятилетия, по мнению многих исследователей, обусловлено появлением новых экологических факторов [8, 9]. Среди антропогенно измененных физических факторов внешней среды как по распространенности, так и по динамичности изменений выделяются электростатические поля (ЭСП) вышефоновых напряженностей.

Ранее нами было показано, что влияние ЭСП приводит к изменениям структурно-функционального состояния сперматозоидов, в частности к изменениям фосфолипидного состава спермальных мембран и количества жизнеспособных гамет в эпидидимисе [17]. Однако для более полной характеристики функционального состояния сперматозоидов необходимо исследовать их акросомальный статус, так как интактная акросома является необходимым условием оплодотворяющей способности сперматозоидов [9, 14].

Целью данной работы являлось исследование влияния ЭСП на акросомальный статус эпидидимальной спермы крыс.

Материал и методика. Опыты проводили на 12-15-недельных белых беспородных крысах-самцах массой 130-150 г. Как для контрольных, так и для опытных животных были созданы одинаковые пищевые, световые и тепловые условия. ЭСП создавали при помощи установок конденсаторного типа с контролируемыми параметрами поля [1]. Объектом исследований служили сперматозоиды, выделенные из хвостика эпидидимиса крыс, подвергшихся одночасовому воздействию ЭСП напряженностью 200 кВ/м.

Выделение жизнеспособных сперматозоидов из придатка эпидидимиса было проведено методом [11]. Сразу после декапитации извлекали эпидидимисы животных, отделяли хвостики. Измельченную ткань хвостика взвешивали и инкубировали в растворе Ringer/Tris в соотношении 1мг : 9мл в течение 30 мин при температуре 4°. Полученную массу фильтровали для отделения больших частиц ткани. Раствор отмывали при температуре +4° в течение 10 мин, вначале при 130×g для осаждения мелких частиц ткани, после – при 650×g для выделения сперматозоидов в виде осадка.

Функциональное состояние сперматозоидов определяли оптическим методом при помощи витального красителя [10]. Сущность метода состоит в том, что жизнеспособные сперматозоиды в метаболически активном состоянии способны превратить резазурин темно-синего цвета в резазурин розового цвета. Доказано, что количество редуцированной краски, следовательно и оптическая плотность, прямо пропорциональны подвижности спермы и количеству морфологически нормальных жизнеспособных сперматозоидов.

Сразу после воздействия поля к выделенным из хвостика эпидидимиса сперматозоидам добавляли раствор Ringer/Tris (0,11M NaCl, 2млM KCl, 1,4 млM CaCl₂, 10 млM Tris, pH 7,2) и краситель в соотношении 1:100. Полученную смесь инкубировали в термостате при температуре 48-50° в течение 60 мин, охлаждали до комнатной температуры и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре (СФ-24) при длине волны 610 нм. Для каждого опыта использовали 12 контрольных и 12 подопытных животных.

Акросомальный статус выделенных гамет определяли методом количественной иммуноморфологии при помощи FITC-PNA (Fluorescein Isothiocyanate-Conjugated Peanut Agglutinin; Sigma) метки, описанной в работе [16]. Сразу после выделения гамет из полученного сперматозоид-содержащего осадка брали по 1мл как для контрольных, так и для опытных образцов. Наносили на предметное стекло, высушивали, добавляли 20μл FITC-PNA и инкубировали в темноте при 4° в течение 15 мин, промывали в холодном фосфатном буфере и высушивали в темноте при комнатной температуре. На полученный препарат наносили фиксирующую среду (4,5мл глицерин, 0,5мл фосфатный буфер, 5мг р-фениленедиамин) и плотно покрывали покровным стеклом. Исследования проведены при помощи люминесцентного микроскопа Воесо (Германия). Микросъемки проводили при помощи цифрового аппарата Canon (Япония). На рис. 1 в качестве примера приведена иллюстрация интактных сперматозоидов, окрашенных данным методом, согласно которому метка избирательно связывается с мембраной акросомального аппарата сперматозоидов и приводит к специфическому ярко-зеленому свечению в участках локализации акросомального аппарата.

Количественно-флуоресцентный анализ проводили на люминесцентном микроскопе ЛЮАМ-ИЗ (ЛЮМО) при помощи флуоресцентной насадки ФМЭЛ-1А (Россия). Было исследовано по 6 препаратов с каждой группы. В каждом препарате было подсчитано по 100 сперматозоидов. Интенсивность флуоресценции – специфическую эмиссию выражали в условных единицах (у.е.).

Результаты и обсуждение. Результатами спектральных исследований с использованием резазурина, проведенных сразу после воздействий ЭСП, показано, что одночасовое воздействие поля приводит к достоверному повышению оптической плотности сперматозоид-содержащего раствора на 45.85%, что свидетельствует об увеличении количества жизнеспособных гамет в эпидидимисе после воздействия поля (рис. 2).

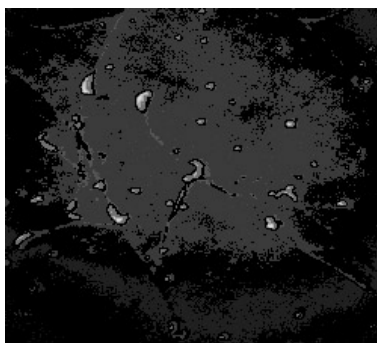
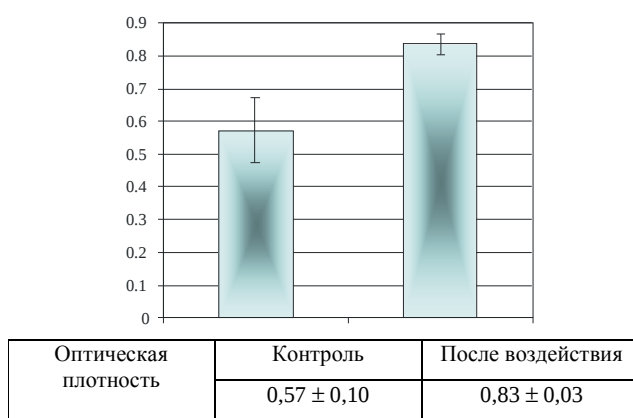


Рис.1. Специфическая эмиссия в акросомальных локусах сперматозоидов обработанных FITC-PNA, об. 40, ок. 10



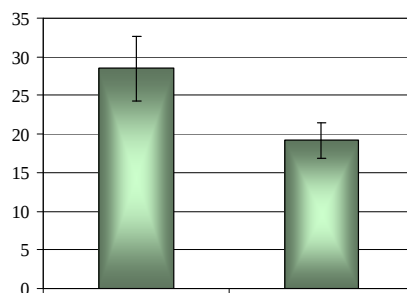
$p < 0.01$

Рис. 2. Изменение оптической плотности сперматозоид-содержащего раствора после одночасового воздействия ЭСП напряженностью 200 кВ/м

Количественно-флуоресцентный анализ показал, что воздействие ЭСП приводит к снижению интенсивности специфического свечения в локусах локализации акросомы на 32.6% по сравнению с контролем (рис.3), что свидетельствует о понижении в эпидидимисе количества сперматозоидов с интактной акросомой (рис. 4).

Известно, что сперматозоиды, выделенные из семенников и начальных отделов эпидидимиса, не имеют оплодотворяющую способность и координированную подвижность. Они полностью созревают и становятся жизнеспособными только в хвостике эпидидимиса [12, 13]. Исходя из этого, нами в качестве объекта исследований использовались сперматозоиды, выделенные из хвостика эпидидимиса.

Ранее нами было показано, что одночасовое воздействие ЭСП напряженностью 200 кВ/м приводит к таким изменениям структурно-функционального состояния семенников и количества гормонов, участвующих в регуляции сперматогенеза, которые активизируют гаметогенез в семенниках крыс [5, 6]. В частности, в просветах семенных канальцев было выявлено заметное повышение количества сперматозоидов по сравнению с контролем.



0.05 > p > 0.025

Специфическая эмиссия, у.е.	Контроль	После воздействия
	28.5 ± 4,2	19,21 ± 2,3

Рис. 3. Изменение специфической эмиссии в акросомальных локусах сперматозоидов, обработанных FITC-PNA после одночасового воздействия ЭСП напряженностью 200 кВ/м

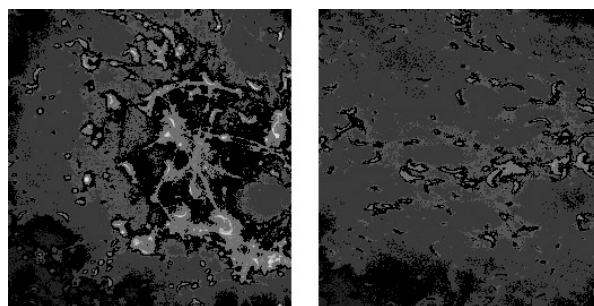


Рис. 4. Специфическая эмиссия в акросомальных локусах сперматозоидов, обработанных FITC-PNA после одночасового воздействия ЭСП напряженностью 200 кВ/м, об. 40, ок.10
а/ контроль,
б/ после воздействия

Результаты спектрального анализа, приведенные в данной работе, согласно которым после одночасового воздействия поля оптическая плотность, следовательно и количество жизнеспособных сперматозоидов, достоверно повысились, полностью согласуются с вышеприведенными данными.

Можно предположить, что при воздействии поля имеет место повышенный выброс сперматозоидов из семенников в эпидидимис. Это наше предположение опирается на работы, в которых показано, что кратковременное воздействие ЭСП приводит к выбросу секретируемых веществ [2, 3, 15].

Нужно отметить, что концентрация и подвижность сперматозоидов сами по себе не могут служить параметром оплодотворяющей способности мужских гамет. Для полноценной оценки влияния ЭСП на функциональную активность сперматозоидов нужно исследовать более определяющие показатели, одним из которых является акросомальный статус гамет [9, 14].

Известно, что акросома находится на головке сперматозоида в виде колпачка и представляет собой видоизмененный аппарат Гольджи. В нем синтезируются факторы, которые растворяют клеточную стенку яйцеклетки. Очевидно, что отсутствие интактной акросомы указывает на потерю оплодотворяющей способности сперматозоида [7, 9, 14].

Как показали результаты проведенных иммуноморфологических исследований, после одночасового воздействия ЭСП заметно снижается интенсивность специфического свечения в акросомальных локусах гамет, что свидетельствует о понижении в эпидидимисе количества сперматозоидов с интактной акросомой. Это может быть как следствием непосредственного влияния изучаемого фактора на мембранные структуры акросомального аппарата, так и результатом нарушения процессов созревания гамет в хвостике эпидидимиса при воздействии поля. Выдвинутые нами предположения опираются на многочисленные литературные данные, свидетельствующие об изменении мембранных структур под воздействием ЭСП [4, 18, 19, 20], и наши предыдущие исследования [17], в которых показано, что воздействие данного фактора приводит к таким изменениям липидного состава мембран эпидидимических сперматозоидов, которые указывают на нарушения процессов созревания гамет в эпидидимисе.

Говорить о конкретных механизмах повреждения акросомального аппарата в результате воздействия исследуемого поля на данном этапе невозможно, однако можно констатировать, что одночасовое воздействие ЭСП приводит к нарушению акросомального статуса сперматозоидов и, следовательно, к уменьшению их оплодотворяющей способности.

Сопоставление полученных данных с литературными и результатами наших предыдущих работ позволяет заключить, что одночасовое воздействие ЭСП напряженностью 200 кВ/м приводит к увеличению выброса гамет из семенников и тем самым повышает количество сперматозоидов в хвостике эпидидимиса, но при этом снижает оплодотворяющую способность гамет вследствие повреждения их акросомального аппарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арцруни Г.Г. Камера для изучения действия ЭСП на мелкие лабораторные животные. Удост. на рац. предложение, № 134, 1983.
2. Арцруни Г., Зильфян А., Азгалдян Н., Довлатян Р. Влияние внешнего электростатического поля на секрецию катехоламинов надпочечниками крыс. Косм. биол. и авиакосм. медицина, 6, с. 67-70, 1987.
3. Арцруни Г., Довлатян Р., Авакян Л. Влияние электростатического поля на структурное и функциональное состояние коры надпочечников. Ж. авиакосм. и эколог. медицины, 30, 1, с. 58-60, 1996.
4. Арцруни Г., Тадевосян Ю., Батикян Т. Качественно-количественный состав и деацилирование фосфолипидов мембран митохондрий крыс после воздействия электростатического поля. Мед. наука Армении, XLI, 1, с. 51-56, 2004.
5. Довлатян Р., Авакян Л., Арцруни Г. Влияние внешнего электростатического поля на структурно-функциональное состояние семенников крыс. Мед. наука Армении, XLIV, 2, с. 33-37, 2004.
6. Саакян Г.В., Арцруни Г.Г. Влияние электростатических полей на уровень половых гормонов. Арм. биолог. Ж., 1-2, с. 80-84, 2006.
7. Barros C., J. Meléndez, M. Valdivia, M. Ríos, R. Yunes. Sperm passage through the egg coats. Biol Research, 26, 417-427, 1993.
8. Carlson E., Giwercman A., Keiding N., Skakkebaek N. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. British Medical Journal, 305, 6854, 609-613, 1992.
9. Dohle G., Jungwirth A., Colpi G., Giwercman A., Diemer T., Hargreave T. Guidelines on Male Infertility. European Association of Urology, 2008.
10. Ericsson R., Ericsson S. Kit for testing human males for fertility. US Patent Issued on November 26, 1991.
11. Gustavo A., Barisone, Hedrick J., Cabada M. Vitelline Envelope of Bufo arenarum: Biochemical and Biological Characterization. Biology of Reproduction 66, 1203-1209, 2002.

12. *Hall J., Hadley J., Doman T.* Correlation between changes in rat sperm membrane lipids, protein, and the membrane physical state during epididymal maturation. *Journal of Andrology*, 12, 1, 76-87, 1991.
13. *Jones R., Mann T., Sherins R.* Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa. Spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 31, 531-537, 1979.
14. *Miyake M., Coney P., Iritani A., Kling O.* Motility and fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa washed by a continuous gradient of Percoll. *Gamete Res.*, 24, 49-57, 1989.
15. *Roshenkech K.* Evaluation of the electrostatic strength at the site of oocytosis in adrenal chromaffin cells. *Biophys. J.*, 75, 3, 1237-1243, 1998.
16. *Roth T., Weiss R., Buff J., Bush L., Wildt D., Bush M.* Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*). *Biol.Reprod.* 58, 475- 482, 1998.
17. *Sahakyan G.V., Batikyan T.B., Artsruni G.G.* The Influence of Electrostatic Fields on Structural and Functional State of Epididymal Spermatozooids. *The New Armenian Medical J.*, 2, 4, 75-84, 2008.
18. *Starke-Peterkovic T., Turner N., Else P.L., Clarke R.J.* Electric field strength of membrane lipids from vertebrate species: membrane lipid composition and Na⁺-K⁺-ATPase molecular activity. *Am. J. Physiol.*, 288, 663-670, 2005.
19. *Vasilkoski Z.* The effect of electric fields on lipid membranes. *Biological Physics*, 1, 15-22, 2006.
20. *Wilkea N., Maggio B.* Effect of externally applied electrostatic fields on the surface topography of ceramide-enriched domains in mixed monolayers with sphingomyelin. *Biophysical Chemistry*, 122, 1, 36-42, 2006.

Поступила 12.05.2010.