

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 591.463.1+612.616.2

А. В. Клепко*, О. А. Мотрина, А. В. Чернишов, С. В. Андрейченко

Державна установа “Національний науковий центр радіаційної медицини
Національної академії медичних наук України”,
вул. Мельникова, 53, м. Київ, 04050

**РОЛЬ ІОННИХ АТФАЗ В ЗАБЕЗПЕЧЕННІ
РУХЛИВОСТІ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ЩУРІВ
ЗА УМОВ ЛОКАЛЬНОГО ОПРОМІНЕННЯ
ТВАРИН РЕНТГЕНІВСЬКИМИ ПРОМЕНЯМИ**

В представленій роботі наведені результати експериментальних досліджень щодо впливу локального опромінення щурів у дозах 0,1–10 Гр на зміни функціональних характеристик іх сперматозоїдів у різні терміни після опромінення. Виявлені кореляції сприяють поглибленню розуміння особливостей перебігу біохімічних та фізіологічних процесів у радіаційно пошкоджених сперматозоїдах на підготовчому до фертилізації етапі.

Ключові слова: сперматозоїди, рухливість, гіперактивація, АТФази, локальне опромінення, рентгенівські промені.

Вступ. Відомо, що фертилізаційну активність мають лише каудальні сперматозоїди на відміну від іммобілізованих сперматозоїдів головного відділу епідидимісів. Потрапляючи до жіночого статевого тракту, сперматозоїди починають здійснювати синусоїdalні коливальні рухи, завдяки чому поступово переміщаються з матки до фалlopієвих труб, де зустрічають ооцити II порядку. Взаємодія сперматозоїда зі зрілим ооцитом має складний характер, оскільки останній, як правило, вкритий двома захисними оболонками [1]. Перша з них утворена кількома шарами клітин кумулюса, а друга, що має називу райдужної оболонки (zona pellucida), містить головним чином колагенові волокна. За останніми науковими даними [2, 3] проникнення сперматозоїда через першу оболонку відбувається завдяки переходу сперматозоїда у стан гіперактивності, що реалізується шляхом генерації асинусоїdalних коливань тілом сперматозоїда. В результаті сперматозоїд занурюється у щілини

* Клепко Алла Володимирівна, e-mail: kallav@mail.ru

© Клепко А. В., Мотрина О. А., Чернишов А. В., Андрейченко С. В., 2012

між клітинами кумулюса та, вигинаючись, розширює міжклітинний простір і таким чином врешті решт наближається до другої захисної оболонки. Саме на цьому етапі починається процес капацитації, який пов'язаний з руйнуванням акросомальної мембрани та початком акросомальної реакції, яка зумовлює вихід внутрішніх акросомальних ферментів назовні та розчинення колагенового шару навколо ооцита. Це дозволяє сперматозоїду повністю підійти до ооцита та вприснути в нього свій ядерний генетичний матеріал. Між тим, міграція ядра сперматозоїда до ооцита сприяє повному завершенню другого редукційного поділу та утворенню яйцеклітини, про що свідчить поява двох пронуклеусів, чоловічого та жіночого, а також другого редукційного тільця в цитоплазмі ооцита.

При цитологічному дослідженні сім'янників опромінених шурів за критерієм дегенерації гамет було встановлено, що сперматоцитам, сперматидам та сперматозоїдам властива більша радіорезистентність, ніж сперматогоніям. Серед останніх найбільша радіочутливість притаманна сперматогоніям типу В, тоді як сперматогонії типу А в цілому відзначаються стійкістю до радіаційного впливу [4].

Аналіз даних літератури щодо спадкових ефектів радіаційного впливу на самців свідчить про те, що поряд з величиною та потужністю дози опромінення принципове значення має стадія сперматогенезу у момент радіаційного впливу, і це явище носить характер загальнобіологічної закономірності [5].

Реалізація пострадіаційних ефектів у сперматогенезі в діапазоні нестерилізуючих доз, коли ще можливе відтворення потомства, тісно пов'язана з пострадіаційним відновленням у статевих клітинах, ступінь вираженості якого залежить від величини та потужності дози радіаційного впливу, його енергії, віку самців під час опромінення, сезонності та інших факторів. Виходячи з високої радіочутливості сперматогенезу та незавершеності процесів пострадіаційного відновлення, навіть при хронічному опроміненні з малими потужностями дози, в ході досліджень відмічені різноманітні відхилення від норми в розвитку потомства від опромінених батьків-самців. Перш за все це стосується зниження репродуктивної здатності потомства, появи різноманітних вроджених вад, індукції канцерогенезу, зміни стійкості до несприятливих впливів, зниження фізіологічної повноцінності тощо [6, 7].

Метою проведеного дослідження було з'ясування біохімічних та фізіологічних змін, які виникають у сперматозоїдах локально опромінених тварин на передфертилізаційній стадії у різні терміни після опромінен-

ня. На нашу думку, такий підхід дає змогу більш глибоко зазирнути у ті події, які відбуваються між сперматозоїдом та яйцеклітиною на етапі їх дистанційної взаємодії перед здійсненням фертилізації.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проводились на статевозрілих білих безпородних шурах-самцях масою 180–250 г розведення місцевого віварію, що утримувались на стандартному раціоні за умов 12-годинного світлового дня.

Одразу ж після декапітації тварин, вирізані епідидиміси поміщали в скляні блюкси з ізотонічним розчином натрію хлориду (NaCl) при кімнатній температурі.

Локальне опромінення голови тварин здійснювали на установці РУМ-17 (фільтри 0,5 мм Cu та 1 мм Al, шкірно-фокусна відстань 50 см, струм 10 mA, напруга 200 кВ, потужність дози 0,17 Гр/хв та 0,34 Гр/хв) в діапазоні доз 0,1–10 Гр. Все тіло тварин, окрім голови, було захищене свинцевим жилетом. Тварин декапітували відразу після опромінення та через 1, 7 і 14 діб.

Для приготування суспензії сперматозоїдів використовували годинникове скло, в яке завчасно поміщали 2 мл спеціального розчину (МТ-1), що складався з 125 mM NaCl , 2,7 mM KCl , 1,8 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgCl_2 , 0,36 mM NaH_2PO_4 11,9 mM NaHCO_3 , 4,5 mM глюкози, 0,09 mM пірувату, 8,9 mM лактату та 0,3 мг/мл БСА [8]. Крім того, на кожні 100 мл середовища додавали 1 мл пеніцилін-стрептоміцинової суміші. Сім'яний придаток розрізали на годинниковому скельці, а його вміст за допомогою скляної палички вичавлювали в розчин і переміщували протягом 30 с. Отриману суспензію переносили в термостат з температурою 37°C. З метою тестування рухливості сперматозоїдів краплю приготовленої суспензії переносили на предметне скельце та переглядали під мікроскопом МБІ-15 на збільшенні х600 з термостатуючим столиком. Для визначення загальної рухливості сперматозоїдів наувмання відбирали 150 сперматозоїдів, в кожній з трьох повторностей від різних тварин. Сперматозоїди вважали рухливими, якщо вони могли переміщуватись або хоча б здійснювати коливальні рухи хвостом. У протилежному випадку сперматозоїди класифікували як такі, що втратили життєздатність.

Концентрацію сперматозоїдів у поживному середовищі підраховували за допомогою камери Горяєва.

Для визначення АТФазної активності використовували мембрани сперматозоїдів, які виділяли методом диференційного центрифугування на ультрацентрифузі Beckman [9]. Спочатку осаджені центрифугуван-

ням при 800 g сперматозоїди гомогенізували в середовищі, що містило 0,25 M сахарози, 0,1 mM ЕДТА, 1,25 mM імідазолу та 1 mM меркаптоетанолу. Гомогенат центрифугували при 800 g 20 хв. Супернатант фільтрували та центрифугували 10 хв при 26 700 g, а потім новоутворений супернатант протягом 1 год знову центрифугували при 101 000 g. Осад ресуспендували в середовищі, що містило 5 mM гістидину, 0,1 mM CaCl₂, 0,2 mM ЕДТА, 0,25 M сахарози, а потім його центрифугували в градієнті сахарози протягом 2 год при 50 000 g. Зону плазматичних мембран розводили дистильованою водою до густини 1,02 та центрифугували 1 год при 112 000 g. Отриманий таким чином осад ресуспендували і використовували в подальших дослідженнях. Кількісно препарати характеризували за вмістом в них білку, який визначали за методом Лоурі [10]. У виділених мембрanaх вивчали активність Mg²⁺-залежних АТФаз: K⁺,Na⁺-АТФази та Ca²⁺-АТФази [11]. Кількість неорганічного фосфору визначали за методом Фіске—Субароу. Активність ферментів виражали в мкмоль Рн/g на 1 mg білку [12, 13].

Статистичну обробку результатів експерименту проводили методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Ст'юдента [14].

Результати та їх обговорення. Досліди по вивченю впливу локального опромінення щурів встановили опосередковану стимулюючу дію радіації на рухливість сперматозоїдів, про що свідчать дані, представлені

на рис. 1. Так, через одну добу після опромінення в діапазоні доз до 1 Гр спостерігається збільшення рухливості сперматозоїдів порівняно з контролем, причому з часом рухливість суттєво посилювалась — на 7-му добу, а згодом помітно спадала — на 14-ту добу.

Хвилясті рухи в хвостовому відділі сперматозоїда генеруються в площині, перпендикулярні парі центральних мікротрубочок аксонеми, і проходять через дублет 1 і між дублетами 5 і 6, супроводжуючись при

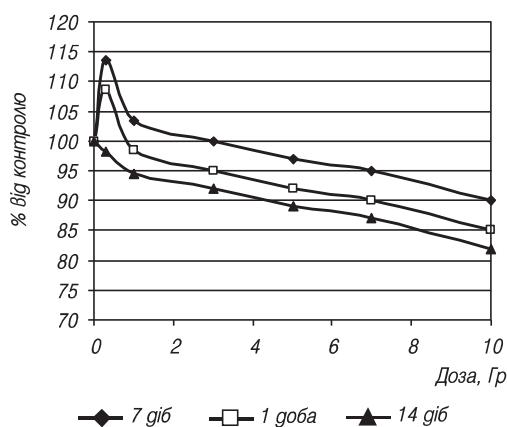


Рис. 1. Вплив локального опромінення головного мозку щурів на рухливість сперматозоїдів в різні пострадіаційні терміни

цьому появою різкого удару в напрямку дублета 1. Створюється врахення, що хвіст сперматозоїда обертається при згинанні, а площа згинання рухається в напрямку до дублета 2. У цій фазі рухового імпульсу відбувається активація тієї частини аксонеми, що містить дублети 1–5. Зовнішні товсті волокна і фіброзна оболонка не беруть участі у розвитку рухового імпульсу, однак контролюють амплітуду коливань хвоста і відсутність обертальних рухів у головному відділі сперматозоїда, поступове звуження якого сприяє зменшенню локальної резистентності хвоста і збільшенню амплітуди його коливань у напрямку кінчика. Наведений механізм характеризує поступальний лінійний рух сперматозоїдів в просторі за допомогою здійснення синусоїdalних хвостових коливань.

При тривалому культивуванні сперматозоїдів на поживному сировищі МТ-1 відбувалось поступове перетворення синусоїdalних коливальних рухів сперматозоїдів на асинусоїdalні, що притаманні лише гіперактивованим сперматозоїдам. При гіперактивації коливальна хвиля захоплює крім аксонеми також і головку сперматозоїда. В перші дні після опромінення гіперактивація знижувалась при всіх дозах, а потім — при дозах 2,5 та 5,0 Гр збільшувалась і досягала на 7-му добу значень, що статистично значуще перевищували контрольні величини. Для дози 10,0 Гр кількість гіперактивованих сперматозоїдів залишалась значно нижчою від контрольного рівня протягом усього післярадіаційного періоду.

Як відомо, іон-транспортні АТФази контролюють перенос іонів K^+ , Na^+ , Ca^{2+} та Mg^{2+} через плазматичні та мітохондріальні мембрани. В умовах пригнічення активності Ca^{2+} -АТФази збільшується вхід кальцію у клітини, що, як правило, поєднується з активацією аденилатциклази плазмалеми. В результаті відбувається синтез ендогенного цАМФ. В наших дослідженнях гіперактивація сперматозоїдів сполучалась зі зростанням внутрішнього цАМФ та частковим пригніченням Ca^{2+} -АТФази.

На рис. 2–3 представлена дозові залежності активності компонентів Mg -залежної іон-транспортної АТФази. Як свідчать результати дослідів, K^+ , Na^+ -АТФаза мала тенденцію до зростання через 7 діб після локального опромінення головного мозку щурів. Це може вказувати на появу стимулюючого ефекту в пострадіаційний період, особливо при дозах 0,1–2,0 Гр. Через одну добу активність ферmenta була на рівні контрольних значень в усьому діапазоні дослідженних доз, а через 14 діб після опромінення ферментативна активність зменшувалась в експоненційній залежності. Значне зростання активності K^+ , Na^+ -компоненти АТФази корелює зі збільшенням кислото- та солерезистентності

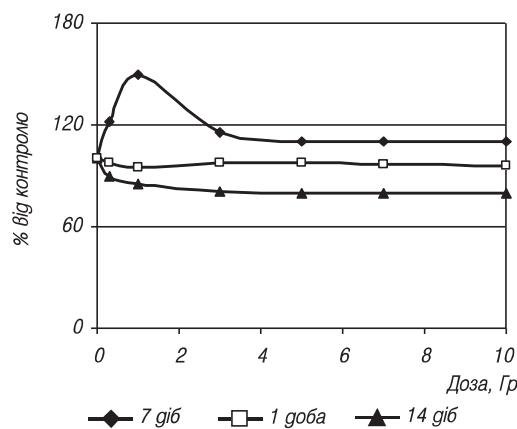


Рис. 2. Вплив локального опромінення головного мозку щурів на активність K^+ , Na^+ -АТФази в різні пострадіаційні терміни

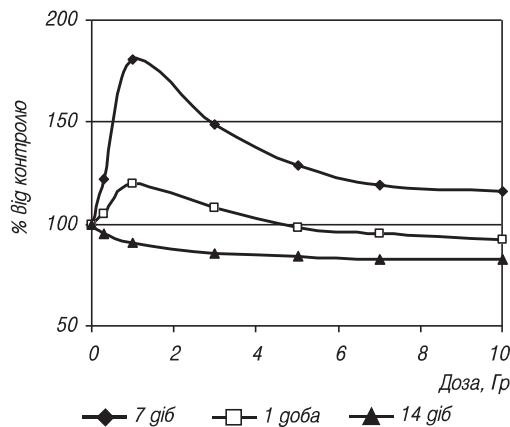


Рис. 3. Вплив локального опромінення головного мозку щурів на активність Ca^{2+} -АТФази в різні пострадіаційні терміни

що локальне опромінення тварин рентгенівськими променями в діапазоні доз 0,1–10 Гр призводить до появи оборотних змін в функціональних характеристиках сперматозоїдів в післярадіаційний період, причому

сперматозоїдів локально опромінених тварин в однаковому діапазоні доз.

Аналіз активності Ca^{2+} -АТФази виявив його зростання за межі контрольної величини для терміну 7 діб в усьому діапазоні досліджених доз, а для терміну в 1 добу в межах 0,1–2,0 Гр. При вищих дозах опромінення ферментативна активність знижувалась до контрольних значень. Для терміну в 14 діб ферментативна активність при дозах 1 Гр не перевищувала контрольного рівня, а при більших дозах починала лінійно зменшуватись (рис. 3).

Одночасно з пригніченням активності Ca^{2+} -АТФази відбувалося зростання активності K^+ , Na^+ -АТФази, що у значній мірі пов'язано з активацією механізмів зворотного зв'язку щодо протидії виникненню на плазматичній мембрани потенціалу пробою та втраті плазмаленою її напівпроникності.

Висновки

1. Проведеними дослідженнями було показано,

при дозі 1,0 Гр початкове збільшення досліджуваних параметрів, а саме рухливості, концентрації сперматозоїдів та чисельності гіперактивованих сперматозоїдів, згодом, у більш пізні терміни після радіаційного впливу повертались до межі контрольних значень. При дозі в 2,5 Гр відбувалась поступова нормалізація цих параметрів, тоді як при дозі в 7,0–10,0 Гр залишкові негативні ефекти все одно зберігались.

2. Отримані результати вказують на сприятливий перебіг відновлювальних процесів у сперматогенному епітелії опромінених тварин, що призводять як до позитивної репопуляції в сім'янках, так і елімінації дефектних статевих клітин.

3. Встановлено, що гіперактивація сперматозоїдів тварин, локально опромінених в дозах 0,5 та 1,0 Гр, відбувалась в умовах різкого зростання ферментативної активності Ca^{2+} -АТФази при одночасному збільшенні активності K^+ , Na^+ -АТФази. Виявлені зміни в активності іон-транспортних АТФаз сперматозоїдів поступово нормалізувались через 14 діб після опромінення.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Huang T. Only acrosome-reacted spermatozoa can bind to and penetrate zona pellucida: a study of the guinea pig / T. Huang, A. Fleming, R. Yanagimachi // J. Exper. Zool. — 1981. — Vol. 217. — P. 287–290.
2. Myles D. Molecular mechanisms of sperm-egg membrane binding and fusion in mammals / D. Myles // Dev. Biol. — 1993 — Vol. 158. — P. 35–45.
3. Myles D. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface protein PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg / D. Myles, P. Primakoff // Biol. Reprod. — 1997. Vol. 56. — P. 320–327.
4. Influence of germ cells upon Sertoli cells during continuous low-dose rate gamma-irradiation of adult rats / G. Pinon-Lataillade, J. F. Vélez de la Calle, M. C. Viguier-Martines [et al.] // Mol. Cell Endocrinol. — 1988. — Vol. 58, No 1. — P. 51–63.
5. Induction of an adaptive response to dominant lethality and to chromosome damage of mouse germ cells by low dose radiation / L. Cai, J. Jiang, B. Wang [et al.] // Mutat. Res. — 1993. — Vol. 303, No 4. — P. 157–161.
6. Шведов В. Л. Влияние сочетанного, радиационного и химического поражения крыс на их функцию размножения / В. Л. Шведов // Радиобиология. — 1990. — Т. 30, № 1. — С. 103–106.
7. Effect of an acute exposure of rat testes to gamma rays on germ cells and on Sertoli and Leydig cell functions / G. Pinon-Lataillade, M. C. Viguier-Martines, A. M. Touzalin [et al.] // Reprod. Nutr. Dev. — 1991. — Vol. 31, No 6. — P. 617–627.
8. White D. R. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility / D. R. White, R. J. Aitken // Gamete Res. — 1989. — Vol. 22. — P. 163–177.
9. Болдырев А. А. Введение в биомембронологию / А. А. Болдырев. — М. : Изд-во Московского ун-та, 1990. — 207 с.
10. Protein measurement with the Folin phenol reagent / Q. H. Lowry, N. I. Rosebrough, A. L. Farr, R. I. Randall // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265–275.

11. Chijssen W. E. Dissociation between Ca²⁺-ATPase and alkaline phosphatase activities in plasma membranes of rat duodenum / W. E. Chijssen, M. D. De Jong, C. H. Van Os // Biochem. Biophys. Acta. — 1980. — Vol. 599, № 2. — P. 538–551.
12. Антонечко Т. С. Біологічна хімія / Т. С. Антонечко. — К. : Вища школа, 1977. — 354 с.
13. Aitken R. Paradoxical stimulation of human sperm motility by 2-deoxyadenosine / R. Aitken, A. Mattei, S. Irvine // J. Reprod. Fert. — 1986. — Vol. 78. — P. 515–527.
14. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. — Минск : Вышэйша школа, 1973. — 320 с.

Стаття надійшла до редакції 25.05.2012.

A. V. Клепко, О. А. Мотрина, А. В. Чернишов, С. В. Андрейченко

*Государственное учреждение “Национальный научный центр радиационной медицины Национальной академии медицинских наук Украины”,
ул. Мельникова, 53, г. Киев, 04050, Украина*

РОЛЬ ИОННЫХ АТФАЗ В ОБЕСПЕЧЕНИИ ПОДВИЖНОСТИ СПЕРМАТОЗОИДОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЛОКАЛЬНОГО ОБЛУЧЕНИЯ ЖИВОТНЫХ РЕНТГЕНОВСКИМИ ЛУЧАМИ

В настоящей работе представлены результаты экспериментальных исследований влияния локального облучения крыс в диапазоне доз 0,1–10 Гр на изменения функциональных характеристик их сперматозоидов в разные сроки после облучения. Выявленные корреляции способствуют углублению нашего понимания относительно протекания биохимических и физиологических процессов в радиационно измененных сперматозоидах на предшествующем фертилизации этапе.

Ключевые слова: сперматозоиды, подвижность, гиперактивация, АТФазы, локальное облучение, рентгеновские лучи.

A. V. Klepko, O. A. Motryna, A. V. Chernyshov, S. V. Andreychenko

*State Institution “National Research Center for Radiation Medicine
of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”,
Melnikov str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine*

ROLE OF IONIC ATP-ases IN SUPPORTING RAT SPERMATOZOA MOTILITY UNDER X-RAY LOCAL IRRADIATION OF ANIMALS

The present research deals with the investigation of post-irradiation effects of gamma-rays on rat spermatozoa. For this purpose animals were irradiated by the doses 0.5; 1.0 and 2.0 Gy, respectively. Afterwards, the functional characteristics of rat spermatozoa in the post-irradiation period up to 80 days were studied. The dose dependent correlations revealed contributes to further deepening of our knowledge concerning the regulation and proceeding of biochemical and physiological processes in the radiation modified spermatozoa at the preparatory to the fertilization stage.

Key words: spermatozoa, motility, hyperactivation, ATP-ases, local irradiation, X-ray.