

АНАЛІЗ ДІЇ ФУЛЕРЕНІВ НА СПЕРМІЇ ЛЮДИНИ ДО ТА ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

(м. Харків)

Робота виконана в рамках НДР «Вивчення змін репродуктивної функції тварин і людини під впливом кріоконсервованих клітинних препаратів та фізико-хімічних факторів», № держ. реєстрації 0111U001197.

Вступ. В теперішній час в різних галузях біології та медицини знаходять широке застосування нанорозмірні матеріали. Значне місце серед наноматеріалів займають нановуглецеві структури, до яких відносять фулерени і нанотрубки. Вуглецеві наночастинки (ВНЧ) інертні, мають розвинену поверхню і пористість, характеризуються високою хімічною і механічною стабільністю, електропровідністю.

Актуальними і дискусійними є питання наявності/відсутності токсичності вуглецевих наносполук та їх взаємодії з клітинами та організмом в цілому. За даними авторів [2,3,7] фулерени мають антиоксидантні, протівірусні та антимікробні властивості і можуть бути використані для створення нових високотехнологічних медичних матеріалів і лікарських препаратів. Ряд авторів відзначають відсутність як гострого, так і хронічного токсичного впливу ВНЧ на організм при різних способах введення, інші, навпаки, у своїх роботах вказують на токсичні ефекти ВНЧ на клітини шкіри людини і головного мозку риб [5].

У зв'язку з розвитком нових допоміжних репродуктивних технологій актуальним є вдосконалення способів кріоконсервування сперми людини для лікування безпліддя. Інкубація з вуглецевими наносполуками може бути застосована як один із методів підвищення якості еякуляту до та після кріоконсервування. Підвищення відсотку рухливих та функціонально-активних спермій людини є досить важливим у випадку астенозооспермії, коли показник рухливості спермій до та після кріоконсервування-відігріву нижчий, ніж при нормоспермії. Використання вуглецевих сполук дозволить, на нашу думку, підвищити кріорезистентність і відновити морфофункціональні властивості спермій після відігріву. Поряд з цим вуглецеві наночастинки можуть чинити токсичну дію та спричиняти порушення генетичного апарату сперматозоїдів. Проведення детальних досліджень перед подальшим використанням зразків спермій після інкубації з вуглецевими наносполуками необхідно з урахуванням показника рухливості, порушень цілісності мембрани та організації хроматина.

Вплив вуглецевих наночастинок на репродуктивну систему людини, а саме на спермії, остаточно не з'ясовано. Використання ВНЧ для збільшення рухливості спермій до та після кріоконсервування може бути одним із шляхів покращення стану сперми людини в кріобіологічних дослідженнях.

Мета роботи – дослідження впливу фулеренів на морфо-функціональний стан спермій людини до та після кріоконсервування.

Об'єкт і методи дослідження. В роботі було досліджено зразки еякулятів чоловіків-донорів у віці від 20 до 40 років при астенозооспермії. Оцінку еякуляту проводили відповідно до рекомендацій ВООЗ [8]. Еякулят збирали в стерильні чашки Петрі або бюкси. Потім еякулят поміщали в термостат (35-37 °С) на 40-60 хвил. У зразках сперми візуально оцінювали кількість спермій з швидким та повільним прямолінійним рухом (фракція а+в), оцінюючи показник рухливості [1]. Концентрацію і рухливість спермій визначали під світловим мікроскопом МБИ 15-У.

В роботі з якості ВНЧ використовували концентрований водний розчин гідратованого С60. Гідратований фулерен С60 (С60НуFn) представляє собою молекулярно-колоїдну систему сферичних фрактальних кластерів, структурною одиницею яких є високогідрофільний комплекс, що складається з молекули фулерену С60, вкритою гідратною оболонкою з 24 молекулами води. Стабільність першої гідратної оболонки підтримується наступними впорядкованими водними оболонками. Розмір наносполуку С60НуFn складає 1,6-1,8 нм [4].

Життєздатність спермій оцінювали в мазках, пофарбованих еозин-нігрозинном. Барвник містив 0,9% розчину NaCl і 0,67 г еозину в 100 мл розчину. Для визначення життєздатності спермій змішували рівні об'єми (по 50 мкл) барвника і суспензії спермій, перемішували і інкубували 30 секунд при 37 °С. Оцінювали життєздатність спермій, а потім визначали процентне співвідношення живих і мертвих спермій, використовуючи той факт, що в препараті головки живих спермій безбарвні, а головки мертвих забарвлюються еозином в рожевий колір. Життєздатність (фарбування нігрозин-еозин), рухливість та стан хроматину (тест 7AAD) визначали після інкубації з ВНЧ. Контролем служили зразки без додавання ВНЧ.

Таблиця 1
Рухливість спермій людини при
астенозооспермії при інкубації з ВНЧ, %

Зразок/ час спостереження, год.	1	2	3
контроль	57,1±1,8	53,0±1,2	52,9±1,3
ВНЧ 10 мкг/мл	60,8±1,2*	71,3±1,1*	69,3±1,4*
ВНЧ 20 мкг/мл	59,3±1,2	60,6±1,1*	59,9±1,5*
ВНЧ 30 мкг/мл	59,0±1,2	55,8±1,1	44,9±1,1*
ВНЧ 40 мкг/мл	54,5±1,2	21,8±0,6*	26,6±0,6*
ВНЧ 100 мкг/мл	49,5±1,2*	10,1±0,5*	8,5±0,7*
ВНЧ 200 мкг/мл	10,1±0,6*	6,1±0,5*	0±0,0*

Примітка: * - вірогідно відносно до контрольних значень, $p < 0,05$.

Таблиця 2
Життєздатність спермій людини при
астенозооспермії при інкубації з ВНЧ, %

Зразок/ час спостереження, год.	1	2	3	24
контроль	99,0±1,2	95,5±1,2	94,5±1,2	94,5±1,7
ВНЧ 10 мкг/мл	96,5±1,2	93,1±1,2	92,2±1,2	79,7±1,7*
ВНЧ 20 мкг/мл	95,2±1,3	91,5±1,2	90,3±1,6	76,2±1,7*
ВНЧ 30 мкг/мл	91,3±1,2*	88,7±1,9*	82,3±1,2*	62,4±1,7*
ВНЧ 40 мкг/мл	85,3±1,1*	86,3±1,7*	78,7±1,7*	47,7±1,8*
ВНЧ 100 мкг/мл	86,2±1,3*	76,2±1,6*	68,7±1,8*	46,0±2,3*
ВНЧ 200 мкг/мл	76,7±1,4*	35,4±2,2*	27,6±2,7*	0,0±0,0*

Примітка: * - вірогідно відносно до контрольних значень, $p < 0,05$.

В якості криозахисного середовища використовували 4% гліцерин і 20% БСА. На першому етапі охолодження зразків проводилося від 25 до 4°C з наступним охолодженням до -70°C у парах рідкого азоту протягом 30 хвилин. По досягненні вказаного часу проводили занурювання у рідкий азот -196°C. Зразки зберігали на протязі 2-х місяців в умовах низькотемпературного банку. Відігрівання здійснювали на водяній бані при 37°C.

Методом ФАКС-аналізу досліджували процеси деконденсації хроматину в сперміях за допомогою барвника 7AAD (Sigma). Проникаючий барвник 7-аміноактіноміцин D (7-AAD) зв'язується з нуклеїновими кислотами. Забарвлення здійснювали за стандартною методикою фірми виробника [6]. Результати аналізували за допомогою програми Win MDI v. 2.8. Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою Microsoft Office Excel 2007.

Результати досліджень та їх обговорення. Дослідження проводились на зразках, які при оцінці по критеріям ВООЗ [8] відповідали астенозооспермії.

Про збереженість морфо-функціонального стану спермій судили по показникам рухливості, цілісності мембрани та стану хроматину.

Оцінювали дію фулеренів в концентраціях 10, 20, 30, 40, 100, 200 мкг/мл на рухливість нативних спермій при інкубації протягом 1-3 годин. Як відомо, кількість спермій зі швидким прямолінійним рухом є найбільш вагомим критерієм успішності допоміжних репродуктивних технологій. Отримані результати представлені в **табл. 1**.

Інкубація зразків спермій з ВНЧ в концентрації 10 мкг/мл протягом 1 години при астенозооспермії призводила до підвищення рухливості фракції «а+в» на 3,7±1,2%, протягом 2 годин – на 18,3±1,2% відносно контролю, протягом 3 годин рухливість спермій зростала на 16,4±1,1% відносно контролю на цьому терміні спостереження (**табл. 1**).

Присутність ВНЧ в концентрації 20 мкг/мл протягом 2 годин також призводила до підвищення показника рухливості спермій на 7,6±1,2% відносно контролю, протягом 3 годин – на 7,0±1,1%. Інкубація з ВНЧ в концентрації 30 мкг/мл на строках спостереження 1-2 години призводила до деякого зростання рухливості спермій. ВНЧ в концентраціях 40, 100 та 200 мкг/мл оказували інгібуючу дію на рухливість фракції «а+в», при чому з ростом концентрації наночастинок ступінь зниження рухливості спермій зростав.

Отримані дані по визначенню відсотка спермій з неушкодженою мембраною при астенозооспермії після інкубації з ВНЧ наведені в **табл. 2**.

Застосування ВНЧ в концентраціях 10 і 20 мкг/мл не призводило до вірогідних змін в кількості спермій з ушкодженою мембраною в досліджених зразках. Спостерігалось вірогідне збільшення кількості спермій з профарбованими мембранами при інкубації з ВНЧ в концентраціях 30-200 мкг/мл на всіх строках спостереження.

Отримані дані по визначенню відсотка життєздатних спермій з неушкодженою мембраною після кріоконсервування-відігріву та в присутності ВНЧ наведені на **рис. 1**. Життєздатність спермій (забарвлення еозином-нігрозином) при астенозооспермії після кріоконсервування-відігріву становила 68,5±2,2%. ВНЧ в концентраціях 10-30 мкг/мл не чинили істотного впливу на показник життєздатності спермій при астенозооспермії. Життєздатність спермій в присутності ВНЧ в концентрації 40 мкг/мл знижувалася відносно контролю на 2,5%.

Також було оцінено показник рухливості спермій після кріоконсервування в присутності ВНЧ (**рис. 2**), тому що саме кріоконсервовані зразки спермій потребують підвищення якості та функціональної активності. Кріоконсервування з вуглецевими наночастинами в концентраціях 10 і 20 мкг/мл викликало підвищення відсотка рухливих спермій фракції «а+в» в 1,45 та 1,33 рази (на 5,4 та 4,0% відносно контролю). Високі концентрації ВНЧ, що додавали до середовища кріоконсервування, знижували показник рухливості спермій після відігріву при астенозооспермії на 3,3 та 7,4%.

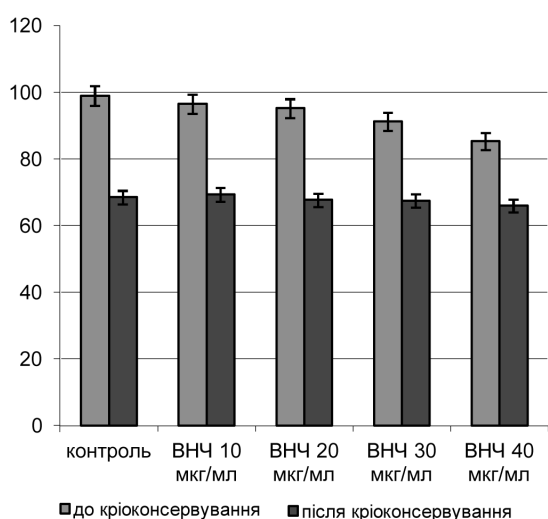


Рис. 1. Життєздатність спермій людини при астенозооспермії до та після криоконсервування в присутності ВНЧ (забарвлення еозин-нігрозіном).

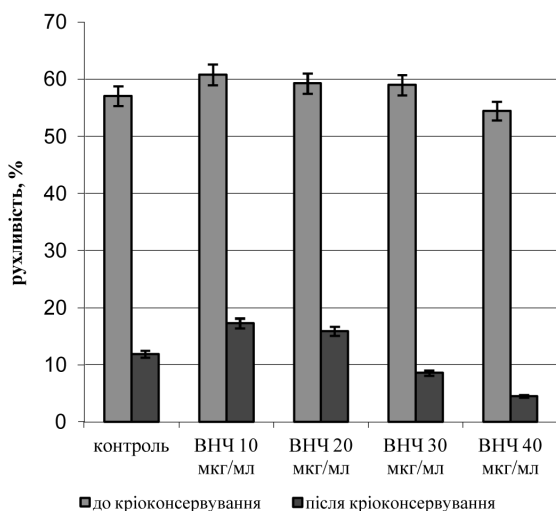


Рис. 2. Рухливість спермій людини при астенозооспермії після криоконсервування в присутності ВНЧ.

Методом проточної цитофлуориметрії були проведені дослідження впливу ВНЧ на стан нуклеарного хроматину спермій до та після криоконсервування-відігріву з використанням 7AAD, який зв'язується з нуклеїновими кислотами.

Показник 7AAD⁻ спермій при астенозооспермії до та після криоконсервування-відігріву складав відповідно 94,2 та 90,5% (табл. 3, 4). Вірогідне збільшення відсотку 7AAD⁺ спермій спостерігалось в нативних зразках при інкубації з ВНЧ в концентраціях 30 та 40 мкг/мл (табл. 3). Показник залишався у межах контрольних значень при застосуванні ВНЧ в концентраціях 10 і 20 мкг/мл.

Після криоконсервування-відігріву вуглецеві наночастинки в концентраціях 30 та 40 мкг/мл знижували кількість 7AAD⁻ спермій при астенозооспермії і дія ВНЧ на стан хроматину та мембран спермій ставала помітнішою з ростом концентрації

ВНЧ (табл. 4). Отримані результати свідчать про те, що застосування ВНЧ в концентраціях 10 і 20 мкг/мл не призводить до активації процесів деконденсації хроматину в сперміях до та після криоконсервування-відігріву за умов астенозооспермії. Збільшення відсотку 7AAD⁺ спермій спостерігалось при концентрації ВНЧ 30 і 40 мкг/мл.

Активацийний вплив низьких концентрацій ВНЧ може бути пов'язаний з тим, що відбувається посилення функціональної активності мітохондрій, а також вуглецеві наночастинки можуть пригнічувати процес перекисного окислення ліпідів та відігравати роль цитосорбентів. Подальше зростання концентрації вуглецевих наноспелук вірогідно може викликати цитотоксичну дію на сперматозоїди людини. Оцінка стану нуклеарного хроматину та цілісності мембран – це якісний показник запліднюючої

Таблиця 3

Вплив ВНЧ на відсоток некротичних спермій при астенозооспермії, % (n = 10, M ± m)

Зразок	7AAD ⁻ , %	7AAD ⁺ , %
Контроль	94,2 ± 0,5	5,8 ± 0,3
ВНЧ 10 мкг/мл	93,9 ± 0,6	6,1 ± 0,2
ВНЧ 20 мкг/мл	94,5 ± 0,5	5,5 ± 0,3
ВНЧ 30 мкг/мл	92,8 ± 0,5*	7,2 ± 0,4*
ВНЧ 40 мкг/мл	92,1 ± 0,4*	7,9 ± 0,4*

Примітка: * - вірогідно стосовно контрольних значень p < 0,05.

Таблиця 4

Вплив ВНЧ на відсоток некротичних спермій після криоконсервування при астенозооспермії, % (n = 10, M ± m)

Зразок	7AAD ⁻ , %	7AAD ⁺ , %
Контроль	90,5 ± 0,4	9,5 ± 0,3
ВНЧ 10 мкг/мл	89,4 ± 0,4	10,6 ± 0,4
ВНЧ 20 мкг/мл	89,5 ± 0,5	10,5 ± 0,5
ВНЧ 30 мкг/мл	86,7 ± 0,3*	13,3 ± 0,4*
ВНЧ 40 мкг/мл	87,1 ± 0,5*	12,9 ± 0,4*

Примітка: * - вірогідно стосовно контрольних значень p < 0,05.

здатності нативних та криоконсервованих спермій людини. Конденсований стан хроматину на заключних стадіях диференціювання дуже важливий для подальшого функціонування сперматозоїда, бо він захищає чоловічий геном від шкідливих впливів та є необхідною передумовою зворотної реорганізації при формуванні чоловічого пронуклеуса. Очевидно, що порушення запрограмованої структурної перебудови хроматину сперматозоїда може призвести до утворення дефектного чоловічого пронуклеуса і негативно вплинути на ранні стадії ембріогенезу.

Висновки. Таким чином було встановлено, що ВНЧ в концентрації 10 і 20 мкг/мл при інкубації протягом 1, 2 та 3 годин при астенозооспермії призводили

до підвищення рухливості фракції «а+в» відносно контролю. ВНЧ в концентраціях 40, 100 та 200 мкг/мл оказували інгібуючу дію на рухливість фракції «а+в», при чому з ростом концентрації наночастинок ступінь зниження рухливості сперміїв зростає. Кріоконсервування сперміїв при астенозооспермії з ВНЧ в концентраціях 10 і 20 мкг/мл призводила до зростання рухливості сперміїв відносно контролю. Високі концентрації ВНЧ, що додавали до середовища кріоконсервування, знижували показник рухливості сперміїв після відігріву. Аналіз отриманих

результатів показав, що ВНЧ в концентраціях 10 та 20 мкг/мл не викликають змін конденсованого стану хроматину та цілісності мембран сперміїв людини при астенозооспермії до та після кріоконсервування-відігріву. Цитотоксичний вплив ВНЧ проявляється при зростанні концентрації до 30-40 мкг/мл.

Перспективою подальших досліджень є визначення механізмів впливу вуглецевих наночастинок на мітохондріальні структури та мембрани сперміїв.

Література

1. Брагина Е. Е. Руководство по сперматологии / Е. Е. Брагина, Р. А. Абдумаликова. – М.: СОРЕК-полиграфия, 2002. – 93 с.
2. Венгерович Н. Г. Биологическая активность нанобиокомпозитов фуллерена C60 / Н. Г. Венгерович, М. А. Тюнин, Антоненкова Е. В. [и др.] // Иммунология. – 2011. – Т. 12, № 1. – С. 161 – 177.
3. Меджидова М. Г. Противовирусная активность аминокислотных производных фуллерена при цитомегаловирусной инфекции in vitro / М. Г. Меджидова, М. В. Абдуллаева, Н. Е. Федорова [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2004. – Т. 49, № 8- 9. – С. 13– 20.
4. Buzaneva E. Self-formation of nanostructures from hydrated aggregates and nanocrystals of (C₆₀)_n molecules on the liquid crystals layer / E. Buzaneva, A. Gorchinskiy, A. Benilov [et al.] // Electronic Properties of Novel Materials. – Progress in Molecular Nanostructures, XIII Int. Winterschool, AIP Conference Proceedings. Kirchberg. – Tyrol, Austria, 1999. – P. 200 – 204.
5. Monteiller C. The proinflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area / C. Monteiller, L. Tran, W. MacNee [et al.] // Occup. Environ. Med. – 2007. – Vol. 64, № 9. – P. 609 – 615.
6. Schmid I. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry / I. Schmid, W. J. Krall, Ch. Uittenbogaart [et al.] // Cytometry. – 1992. – Vol. 13, № 2. – P. 204 – 208.
7. Wang I. C. C60 and water-soluble fullerene derivatives as antioxidants against radicalinitiated lipid peroxidation / I. C. Wang, L. A. Tai, D. D. Lee [et al.] // J. Med. Chem. – 1999. – Vol. 42. – P. 4614 – 4620.
8. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen fifth edition / World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. – 2010. – P. 287.

УДК 539. 21-022. 532:546. 26:612. 616. 014. 43

АНАЛІЗ ДІЇ ФУЛЛЕРЕНІВ НА СПЕРМІЇ ЛЮДИНИ ДО ТА ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ

Павлович О. В.

Резюме. В роботі досліджено вплив фуллеренів на морфо-функціональний стан сперміїв людини при астенозооспермії до та після кріоконсервування. Показано, що фуллерени в концентраціях 10 та 20 мкг/мл не викликають змін конденсованого стану хроматину та цілісності мембран сперміїв людини при астенозооспермії до та після кріоконсервування-відігріву. Цитотоксичний вплив фуллеренів на спермії людини проявляється при зростанні концентрації до 30-40 мкг/мл.

Ключові слова: сперма людини, фуллерени, кріоконсервування, рухливість, мембрана, хроматин.

УДК 539. 21-022. 532:546. 26:612. 616. 014. 43

АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ ФУЛЛЕРЕНОВ НА СПЕРМИИ ЧЕЛОВЕКА ДО И ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

Павлович Е. В.

Резюме. В работе исследовано влияние фуллеренов на морфо-функциональное состояние спермиев человека при астенозооспермии до и после криоконсервирования. Показано, что фуллерены в концентрациях 10 и 20 мкг/мл не вызывали изменений конденсированного состояния хроматина и целостность мембран спермиев человека при астенозооспермии до и после криоконсервирования-отогрева. Цитотоксическое действие фуллеренов на сперми человека проявляется при росте концентрации до 30-40 мкг/мл.

Ключевые слова: сперма человека, фуллерены, криоконсервирование, подвижность, мембрана, хроматин.

UDC 539. 21-022. 532:546. 26:612. 616. 014. 43

Analysis of Fullerene's Action on Human Sperm before and after Cryopreservation

Pavlovich E. V.

Abstract. Development of assisted reproductive technologies stipulated the search for methods improving the properties of human sperm. Information about their potential toxicity and effects on human health is necessary for use of nanomaterials in the clinical setting. Application of carbon nanoparticles can increase cryoresistance and

recover sperm motility after cryopreservation. Increase the percentage of motility and functional active of human sperm before and after cryopreservation is very important in case of asthenozoospermia. Detailed research before using sperm samples after incubation with fullerenes must be performed considering their motility rate, disorders of membrane integrity and chromatin organization.

The effect of carbon nanoparticles on human reproductive system is not completely understood. Usage of carbon nanoparticles for increase of sperm motility before and after cryopreservation can be way to improve the state of human sperm in cryobiological research.

The aim of our work was studying of the carbon nanoparticles effect on the morphological and functional characteristics of the human sperm at asthenozoospermia before and after cryopreservation. The proportion of total and progressively motile sperm was estimated. Viability and chromatin state was determined after incubation with fullerenes. As cryoprotective medium 4 % glycerol and 20 % BSA with Hanks' solution (PAA, Austria) was used. Cryopreservation was performed under cryobank. The processes of of nuclear chromatin decondensation were studied with 7-Amino-Actinomycin (7AAD) (BD) dyes using FACS Calibur Becton-Dickinson flow cytometer.

It was evaluated the effect of fullerenes at concentrations of 10, 20, 30, 40, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ on sperm motility after incubation for 1-3 hours. It was established that fullerenes of 10 and 20 $\mu\text{g/ml}$ concentration incubated with human spermatozoa at asthenozoospermia for 1, 2 and 3 hours caused the increase of motility index relative to the control. Carbon nanoparticles at concentrations of 40, 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ had inhibitory effect on the motility of active fraction, and with increasing concentration of the nanoparticles the degree of the spermatozoa motility reduction increased. Cryopreservation of sperm at asthenozoospermia with fullerenes in concentrations of 10 and 20 $\mu\text{g/ml}$ led to the increase in motility relative to the control, while high concentrations of fullerenes used as additives to the cryopreservation medium, reduced sperm motility rate after thawing. The impact of fullerenes on the spermatozoa nuclear chromatin state before and after cryopreservation by flow cytometry was studied. It was shown that fullerenes with concentrations of 10 and 20 $\mu\text{g/ml}$ did not cause any changes in the condensed chromatin state and human sperm membrane integrity at asthenozoospermia before and after freeze-thawing. Cytotoxic effect of fullerenes on human sperm is manifested when concentration growing up to 30-40 $\mu\text{g/ml}$.

Activating effect of low concentrations of fullerenes can be due to amplification of the functional activity of mitochondria, and carbon nanoparticles can inhibit lipid peroxidation process and play a role of cytosorbents. Further increasing the concentration of carbon nanoparticles cause cytotoxic effects on human sperm. Condensed state of chromatin in the final stages of differentiation is very important for the further functioning sperm, because it protects the male genome from harmful influences and is a prerequisite for the return of reorganization in the formation of the male pronucleus.

Keywords: human sperm, fullerenes, cryopreservation, motility, membrane, chromatin.

Рецензент – проф. Шепітько В. І.

Стаття надійшла 17. 06. 2014 р.