



ВЛИЯНИЕ НА ОБЛЪЧВАНЕТО С УЛТРАВИОЛЕТОВИ ЛЪЧИ ВЪРХУ ПРОЯВАТА НА АПОПТОЗА – СВЪРЗАНИ БЕЛЕЗИ ПРИ СПЕРМАТОЗОИДИ ОТ КОЧ

А. КУКОВ, Д. ДАСКАЛОВА, Е. СОЛЕНКОВА, М. ИВАНОВА-КИЧЕВА,
И. НИКОЛОВ, М. СЪБЕВ, Х. ХРИСТЕВ¹

ИБИР ”Акад. К. Братанов”БАН; ¹Аграрен Университет – Пловдив

INFLUENCE OF UV – IRRADIATION ON THE APPEARANCE OF APOPTOSIS – BINDED MARKS OF RAM’S SPERMATOOZA

A. Kukov, D. Daskalova, E. Solenkova M. Ivanova - Kicheva, I. Nikolov, M. Sabev,
Hr. Hristev*

IBIR–BAS- Sofia, *Agricultural University – Plovdiv
E-mail: hrh.1234@abv.bg

ABSTRACT

In-vitro investigations on the influence of UV- rays on the marks of apoptosis-manifestation on ram’s spermatozoa have been conducted. The apoptosis changes increase on 18.92 ± 4.08 compare to 2.3 ± 0.89 for the non rayed gametes. The DNA – fragmentation increase up to 5% for the spermatozoa and over 50% for the somatic cells. The authors suggest, that the UV-rays provoke molecule remoulding in the DNA-structure and the other cell- organelles, leaded to negative changes of the gamete’s functions.

Keywords: UV-rays, apoptosis, ram’s spermatozoa

В последните години зачестиха данните за неблагоприятното влияние на ултравиолетовите лъчи (UV) върху организма на хора и животни, особено като канцероген на околната среда. Целта на изследванията е да се проучи въздействието на UV лъчи върху сперматозоиди във връзка с изясняването на молекулната основа на някои от нарушенията във фертилитета. Проведени са in vitro изследвания за влиянието на UV лъчи върху проявата на белези на апоптоза при сперматозоиди от коч. Опитите са направени върху 45 еякулата от 5 коча, облъчени с $UV \leq 280\text{nm}$. Резултатите показват, че UV лъчи индуцират в 18.92 ± 4.08 от сперматозоидите апоптични промени в пламената мембрана (ПМ), докато при контролните проби такива промени са в 2.30 ± 0.89 от спермалните клетки ($p < 0.05$). Наблюдава се значително намаляване на функционалността на митохондриите до 41.36 ± 4.43 – за опитните, при 83.07 ± 5.85 – за контролните проби ($p < 0.001$). При облъчени с UV лъчи сперматозоиди и Jurkat клетки, ДНК фрагментацията нараства до 5 % за сперматозоидите и над 50 % за соматичните клетки. Тези данни позволяват да се предположи, че UV лъчите предизвикват молекулно ремоделиране в структурата на ДНК и другите клетъчни органели, което води до негативни промени във функцията на гаметите и понижаване на оплодителната им способност.

УВОД

Ролята на ултравиолетовото облъчване представлява особен интерес през последните години, като важен екологичен фактор на околната среда. Известно е, че UV лъчите имат многостранна роля върху организмите – както позитивна, така и негативна. Сперматозоидите от бозайниците нямат директен достъп до UV лъчи. Навлизането в последните години на репродуктивните технологии за *in vitro* оплождане при хора и животни, налага гаметите да бъдат изложени за определен период от време на UV облъчване. Подобно на пръв поглед безвредно облъчване може да се предизвиква чрез флоуцитометрия, имунофлуоресценция и други методи за анализ, където се използват лампи с различна дължина на вълните – UVA (400-320 nm), UVC (320–280 nm) или UVB ($\leq 280\text{nm}$). Доказано е обаче, че методите за сортирането на сперматозоиди по пол с X или Y хромозома, предизвикват понижаване на оплодителния им потенциал. Вероятна причина за това е, че те са подложени на продължителни процедури *in vitro*, оцветяване на ядрото с флуорохроми, както и излагане на UV радиация и др. [6]. Всички тези данни поставят въпросът за ролята на UV облъчването при *in vitro* съхранение на гаметите. Известен е фактът, че UV лъчите причиняват определени промени в соматичните клетки, засягащи най-вече ДНК в ядрото [2, 5]. При сперматозоидите този въпрос все още не е достатъчно изяснен. Това ни даде основание да изследваме въздействието на UV облъчване върху биологичните параметри на сперматозоиди от коч при *in vitro* съхранение във връзка с промени в оплодителната способност.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

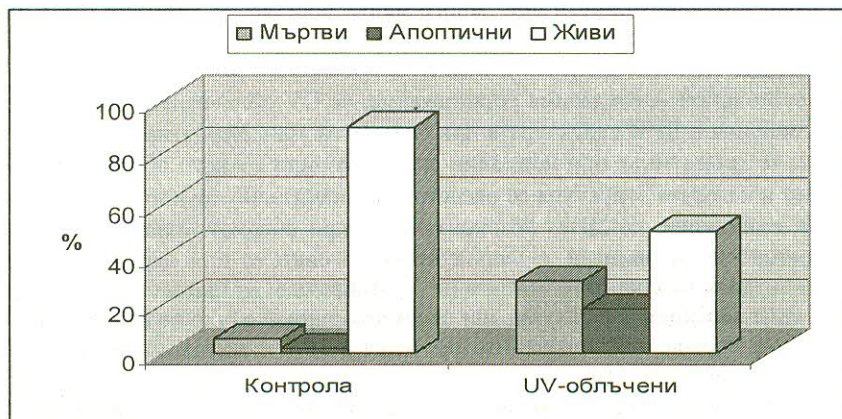
В изпълнение на поставената задача е работено с биологичен материал – сперма от полово зрели кочове, порода фризийска и черноглава плевенска. За провеждането на експериментите са използвани еякулати от 5 коча. Анализът на семенния материал е извършен чрез прилагане на следните изследвания: микроскопска оценка за обща концентрация, мъртви и патологични сперматозоиди с помощта на камера на Бюркер, обем, цвят и рН, микроскопска преценка на основните параметри – подвижност, наличие на клетъчни елементи и аглутинация; термична проба за преживяемост на сперматозоидите при 37°C . В процеса на работа е използвана следната среда: Na_2HPO_4 – 0.6 g, глюкоза – 3.0 g, K_2HPO_4 – 0.01 g, NaCl – 0.2 g, d H_2O – 100 ml, рН 6.6–7.0. След получаване и преценка семенните проби се разделят на 3 равни обема. Всяка част се разрежда 1+6 със средата за съхранение. Всички проби се съхраняват в термостат ТВ 50 при 37°C . Облъчването е направено за 30 min с $\text{UV}_{\leq 280\text{nm}}$. Анализът на функционалното състояние на сперматозоидите включва:

1. Определяне интегритета на ПМ, чрез Annexin V/6CFDA (Sigma) кит.
2. Изследване митохондриалния трансмембранен потенциал чрез R123 (Sigma).
3. Микрогел-електрофореза на индивидуални клетки чрез Comet assay.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите от сравнителния анализ на началния мотилитет (на 10-ата минута) на сперматозоидите при контролната и опитната група, (облъчени с UV), са в близки граници. С времето мотилитетът при облъчените с UV лъчи сперматозоиди рязко спада и на петия час от съхранението достига до 25.12 ± 7.33 при 50.79 ± 8.21 за контролите ($p \leq 0.05$). Връзката на тези промени с функционалността на ПМ са представени на фигура 1. От анализа на данните се установява, че UV индуцира промени в молекулната организация на ПМ. Това се изразява в трайна транслокация на ФС на

външната повърхност при все още живи и подвижни сперматозоиди – Annexin V/6CF⁺. При Annexin V-реагиралите сперматозоиди се регистрират участъци от ПМ, в които има трайна транслокация на молекули ФС на екстрацелуларната повърхност на ПМ при съхранена функционалност на мембраната. При 6CF⁺-реагиралите сперматозоиди е съхранена жизнеспособността и функционалността на вътреклетъчните структури на гаметите.



Фигура 1. Изследвания върху интегритета на ПМ при сперматозоиди от кош с Annexin V/6CFDA (Sigma) кит.

В развитието на процеса са ангажирани митохондриите на сперматозоидите. Резултатите от изследванията върху митохондриалния трансмембранен потенциал на сперматозоидите са представени на таблица 1.

Таблица 1

Анализ на митохондриалния трансмембранен потенциал на сперматозоиди от кош с R123 (Sigma).

Групи	R123 n = 8		
	(-)	(+)	(++)
Контрола	9.63 ± 3.73 ^a	7.30 ± 2.78 ^{aa}	83.07 ± 5.85 ^a
UV- облъчени	10.33 ± 2.78 ^a	48.32 ± 5.29 ^{bb}	41.36 ± 4.43 ^b

*Представените данни са ±S.E.M., като разликите между a и b във вертикалните колони са – a – b – p<0.05 и aa – bb – p<0.001.

Установи се, че при контролната група клетки процентът, показващи (+) реакция, е 7.30 ± 2.78, докато при облъчените сперматозоиди този процент нараства достоверно до 48.32 ± 5.29 (p<0.001). В такива сперматозоиди се наблюдават начални промени в интактността на митохондриите, което се изразява в по-слаба реакция, но сперматозоидите все още са запазили своята подвижност. Вероятно има промяна във вида на движението и скоростта на предвижване на сперматозоидите. За да получим отговор на това предположение и да разберем дали има някои специфични различия в групите живи сперматозоиди и при тези облъчени с UV лъчи, които са свързани с функционалната компетентност на сперматозоидите, проведохме изследвания върху

интегритета на ДНК чрез Comet assay. Направен е сравнителен анализ за определяне *in vitro* на количествени различия на нарушения в ДНК при сперматозоиди и клетки от линията Jurkat. Резултатите показват нарастване на броя на сперматозоидите и Jurkat клетките с промени в ДНК структурата след *in vitro* облъчването с UV лъчи в сравнение с контролната група. Също така се наблюдават известни различия в количеството на увредените клетки и във вида на кометите. Докато при сперматозоидите се установяват единични комети при много малък процент от клетките (до 5 %), то при Jurkat клетките наблюдаваните комети нарастват значително и засягат по-голяма част от клетките.

В настоящите изследвания установяваме, че UV облъчването води до незначителни изменения в ДНК структурата при сперматозоиди. Вероятна причина за тези резултати е, че хроматинът при нормални сперматозоиди е много добре пакетирани и нарушенията в неговата структура се регистрират значително трудно. Повечето автори изказват становище, че ДНК фрагментацията при сперматозоиди е резултат на различни патологични процеси в репродуктивната система или нарушения в регулацията и контрола на сперматогенезата [4, 7]. Въпреки това произходът и значението на ДНК фрагментацията в еякулирани сперматозоиди все още не са напълно изяснени. От друга страна, наблюдаваните промени в ПМ и митохондриите след UV облъчване са значителни. Известно е, че митохондриите са един от източниците на енергията, необходима за предвижването на сперматозоидите и оплождането на яйцеклетката. Също така е известно, че интактната ПМ трябва да претърпи физиологични промени, които да я правят годна да се прикрепят към zona pellucida [1, 3]. Установените от настоящите изследвания нарушения в липидната асиметрия на ПМ и промените в трансмембрания митохондриален потенциал на сперматозоидите биха могли да се приемат като резултат от UV облъчването. Тези промени повлияват на функционалността на сперматозоидите и вероятно водят до понижаване на оплодителната им способност при *in vitro* съхранение.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Иванова – Кичева М, Даскалова Д, Димитров А, 2006.** Сигнални пътища при капацитация и апоптоза във връзка с поведението на биомолекули и структури при сперматозоиди. Животновъдни науки, 4, 36-42 .
2. **Evans G, Hollinshead FK and Maxwell WMC, 2004.** Preservation and artificial insemination of sexed semen in sheep. *Reprod. Fertil. Dev.*; 16: 455-464.
3. **Gadella B, Harrison RAP, 2002.** Capacitation induces Cyclic Adenosine 3,5 – monophosphate-Dependent, but Apoptosis-Unrelated, Exposure of Aminophospholipids at the Apical Head Plasma Membrane of Boar Sperm Cells. *Biology of Reproduction* 67:340-350
4. **Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Dondero F, Lenzi A, 2000.** Study of apoptosis DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 15: 830-839.
5. **Guthrie HD, Johnson LA, Garrett WM, Welch GR and Dobrinsky JR, 2002.** Flow cytometric sperm sorting: effects of varying laser power on embryo development in swine. *Mol. Reprod. Dev.*; 14:503-508.
6. **Hollinshead FK, Gillan L, O'Brien JK, Evans G and Maxwell WMC, 2003.** *In vitro* and *in vivo* assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing. *Reprod. Fertil. Dev.*; 15: 351-359.
7. **Lachaud C, Tesarik J, Canadas M, Mendoza C, 2004.** Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 19: 607-610.