

Акцепторы оптического излучения видимой области спектра, определяющие светоиндуцированные изменения функциональных характеристик сперматозоидов животных

В. Ю. Плавский¹, А. И. Третьякова¹, А. В. Микулич¹, А. Н. Собчук¹, А. И. Будевич², Д. М. Богданович², Н. В. Барулин³, А. А. Романенко¹, Л. Г. Плавская¹, Т. С. Ананич¹, О. Н. Дудинова¹, И. А. Леусенко¹

¹*Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси, Минск;
e-mail: v.plavskii@ifanbel.bas-net.by*

²*РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству», Жодино;*

³*Белорусская государственная сельскохозяйственная академия, Горки*

Показана способность низкоинтенсивного света оказывать влияние на функциональные характеристики сперматозоидов животных (подвижность после активации водой, сохранность, оплодотворяющую способность и др.). В сперме животных различного видового происхождения (хряков, козлов, осетровых рыб) обнаружены безметалльные порфириновые (протопорфирин IX) и флавиновые сенсibilизаторы, способные выступать в качестве акцепторов оптического излучения видимой области спектра, ответственных за реализацию регуляторного действия света (фотобиомодуляции) путем генерации активных форм кислорода (АФК). Образование АФК подтверждено хемилюминесцентным методом. Идентифицировать порфириновые соединения, присутствующие в сперме в достаточно низких концентрациях (менее 10^{-8} М), удалось благодаря разработанной методике, основанной на предварительной обработке спермы соляной кислотой и последующем спектрально-флуоресцентном анализе надосадочной жидкости после ее центрифугирования. Показано, что такая кислотная обработка с одной стороны повышает интенсивность флуоресценции безметалльных порфиринов, а с другой – вызывает тушение флуоресценции флавиновых соединений, обладающих интенсивным свечением в нативной сперме, затрудняющим регистрацию слабой флуоресценции порфириновой компоненты.

Ключевые слова: лазерное излучение, светодиоды, сперматозоиды, подвижность сперматозоидов, оплодотворяющая способность, фотоакцепторы, активные формы кислорода

Введение

Способность низкоинтенсивного излучения видимого спектрального диапазона оказывать модулирующее действие на функциональные характеристики спермы человека и животных в настоящее время практически не ставится под сомнение [1, 2]. Светоиндуцированные изменения скорости движения и подвижности сперматозоидов, влияние света на поддержание функциональных характеристик спермы при хранении, а также на оплодотворяющую способность сперматозоидов получены как при воздействии оптического излучения на половые продукты млекопитающих (человека, хряка, лошади, осла, быка, барана, кролика, собаки, мыши), так и птиц и холоднокровных гидробионтов (рыб и морских ежей). Многочисленными исследованиями установлено, что влияние на функциональные характеристики спермы способно оказывать излучение фактически любой длины волны видимой области спектра. Причем эффекты фотобиомодуляции в отношении сперматозоидов инициируются как воздействием лазерных и светодиодных источников, так и излучением ламп. Считается, что повышение функциональных характеристик спермы под действием излучения обусловлено увеличением синтеза аденозинтрифосфата (АТФ), поскольку наблюдается положительная корреляция между подвижностью сперматозоидов и содержанием в них АТФ. Однако, фотофизические и фотохимические механизмы, определяющие регуляторное действие оптического излучения на сперму животных, по-прежнему остаются не выясненными. Не ясны также макромолекулы, взаимодействие которых со светом приводит к изменению функциональных характеристик сперматозоидов.

В поисках ответа на поставленные вопросы мы исходили из следующих предположений: а) в основе регуляторного действия света лежит изменение окислительно-восстановительного статуса клеток, инициируемое образованием активных форм кислорода (АФК) в результате возбуждения эндогенных фотосенсибилизаторов; б) фотосенсибилизаторами в клетке выступают флуоресцирующие соединения, концентрация которых достаточно низкая, чтобы исключить протекание выраженных деструктивных процессов.

Цель настоящей работы – обнаружение и идентификация эндогенных молекул, способных генерировать активные формы кислорода при воздействии оптического излучения видимого спектрального диапазона как на сперму животных. Для выяснения степени общности полученных результатов исследования выполнялись, используя как сперму рыб, так и сперму млекопитающих (хряков и козлов).

1. Материалы и методы

Исследования по обнаружению и идентификации эндогенных фотосенсибилизаторов, способных выступать в качестве первичных мишеней, ответственных за реализацию эффектов фотобиомодуляции, выполнялись со спермой сибирского осетра, а также хряков и козлов без использования разбавителей.

Для выяснения вклада эндогенных молекул-флуорофоров в эффекты сенсибилизированного образования активных форм кислорода исследовались спектры аутофлуоресценции спермы, а также спектры возбуждения флуоресценции. В некоторых случаях сперму разбавляли физраствором. Указанные измерения проводились с использованием спектрофотометра Cary - 500 Scan UV - Vis - NIR (Varian, США) и спектрофлуориметра Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon Inc., Франция) в кварцевых кюветах с длиной оптического пути от 3 до 10 мм. Для выяснения вклада активных форм кислорода в фотобиологические эффекты, инициируемые воздействием на сперму лазерного излучения зеленой и красной областей спектра, использовали метод люминол-зависимой хемилюминесценции (хемилюминометр Lum 5773, ДИСофт, Россия).

2. Результаты и обсуждение

Получены подтверждения способности лазерного излучения низкой интенсивности (плотность мощности $I = 0.5\text{--}30$ мВт/см²) зеленой (длина волны $\lambda = 532$ нм) и красной ($\lambda = 632,8$ нм) областей спектра оказывать влияние на функциональную активность сперматозоидов. Детальные исследования, выполненные с использованием спермы осетровых рыб, показали наличие выраженных эффектов при воздействии излучения вышеуказанных параметров через 24 и 48 ч после облучения и последующего хранения в охлажденном состоянии. Подтверждения модулирующего действия света получены при анализе продолжительности подвижности сперматозоидов после их активации водой, проценту подвижных сперматозоидов и эффективности фертилизации (оплодотворения). Отличительной особенностью зависимости подвижности сперматозоидов (в процентах к контролю) от энергетической дозы излучения является ее бифазный характер: при малых дозах воздействующего излучения отмечается незначительный стимулирующий эффект, который увеличивается с увеличением энергетической дозы до достижения максимума; дальнейшее увеличение дозы приводит сначала к снижению стимулирующего эффекта до контрольного уровня, а затем – к угнетению подвижности сперматозоидов по сравнению с необлученными образцами. По нашему мнению, такой вид дозовых зависимостей является типичным для регуляторного действия света, и соответствует известному закону (правилу) Арндта-Шульца [1, 2].

Исследования, выполненные в настоящей работе, впервые показали присутствие в сперме животных (козлов, хряков, осетровых рыб), наряду с флавиновыми

сенсibilизаторами, производных протопорфирина IX (PPIX). Следует отметить, что наличие интенсивной флуоресценции флавиновой компоненты спермы, а также светорассеяния весьма затрудняет регистрацию порфириновых фотосенсibilизаторов, присутствующих в сперме в весьма низкой концентрации (менее 10^{-8} М), и к тому же характеризующихся низким квантовым выходом флуоресценции (для PPIX $\phi_{\text{фл}} = 0,04$). Для повышения аналитических возможностей детектирования производных PPIX нами разработан новый метод, основанный на предварительной обработке спермы 3М соляной кислотой. Такая обработка резко снижает интенсивность флавиновой компоненты спермы и усиливает флуоресценцию свободных порфиринов за счет их дезагрегации и перехода в дипротонированную мономерную форму. На рис. 1 и рис. 2 представлены спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции спермы различного видового происхождения как без пробоподготовки, так и после предварительной обработки спермы 3М соляной кислотой.

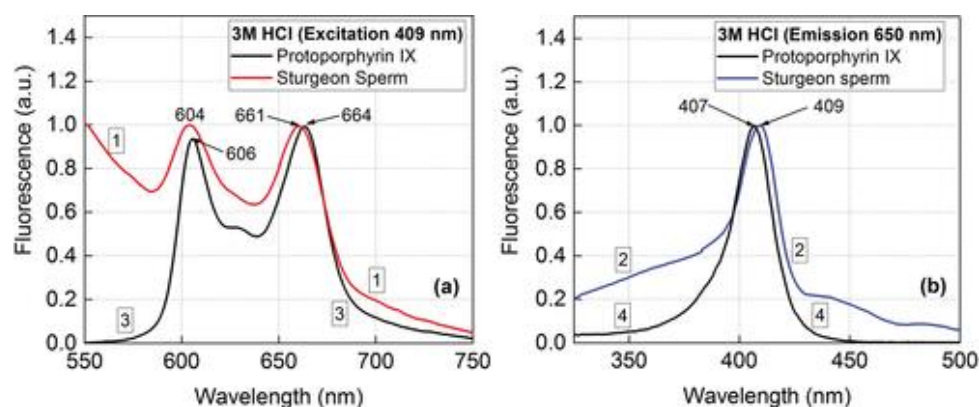


Рис. 1. – Спектры флуоресценции (1, 3) и возбуждения флуоресценции (2, 4) спермы осетровых рыб (1, 2) и PPIX (3, 4) в 3 М соляной кислоте. $\lambda_{\text{возб}} = 410$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 670$ нм.

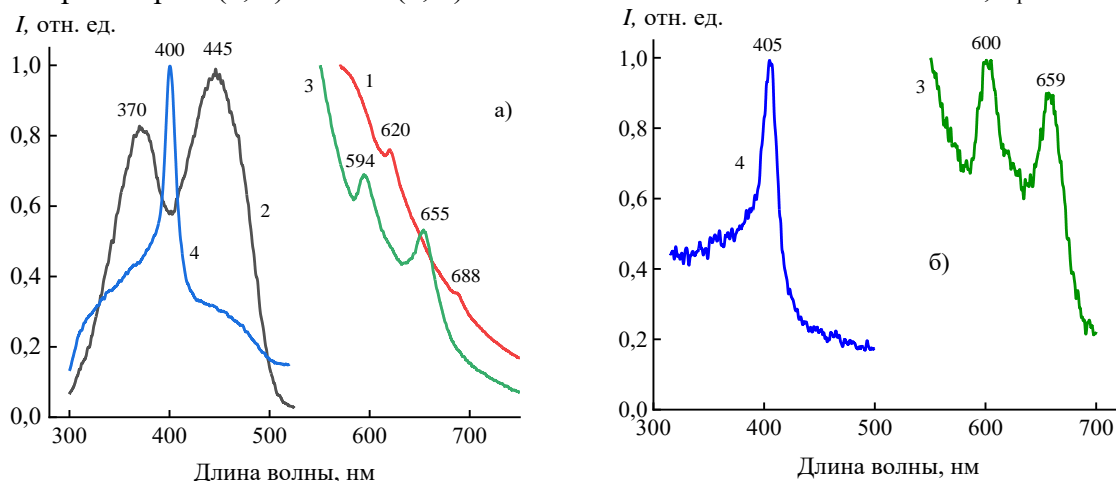


Рис. 2. – Спектры флуоресценции (1, 3) и возбуждения флуоресценции (2, 4) спермы козла (а) и хряка (б) в отсутствие добавок (1, 2) и в присутствии 3 М НСl: $\lambda_{\text{возб}} = 532$ нм (1), $\lambda_{\text{возб}} = 405$ нм (3), $\lambda_{\text{рег}} = 623$ нм (2); $\lambda_{\text{рег}} = 655$ нм (4).

Представленные данные не оставляют сомнений о присутствии порфириновых фотосенсibilизаторов в сперме. Сравнительный анализ показал, что наиболее высокие концентрации производных PPIX регистрируются в сперме осетровых рыб и козла; наиболее низкая – в сперме хряка. На основании полученных результатов сделан вывод, что протопорфирины наряду с соединениями флавиновой природы, присутствующие в сперме животных и способные эффективно генерировать синглетный кислород, могут выполнять функцию фотоакцепторов оптического излучения видимой области спектра.

С помощью люминол-зависимой хемилюминесценции впервые получены подтверждения светоиндуцированной генерации активных форм кислорода: наиболее интенсивная хемилюминесценция регистрируется при использовании спермы осетровых рыб и козла; наиболее слабая – при использовании спермы хряка.

Заключение

Выполненные исследования свидетельствуют о способности порфириновых и флавиновых фотосенсибилизаторов, присутствующих в сперматозоидах в низких концентрациях, выступать акцепторами оптического излучения и изменять окислительно-восстановительный баланс половых клеток животных за счет светоиндуцированной генерации активных форм кислорода.

Литература

1. Plavskii V., Mikulich A., Barulin N., Ananich T., Plavskaya L., Tretyakova A., Leusenka I. Comparative effect of low-intensity laser radiation in green and red spectral regions on functional characteristics of sturgeon sperm. *Photochem Photobiol.* 2020. Vol. 96, No 6, P. 1294-1313.
2. Plavskii V. Y., Barulin N. V., Mikulich A. V., Tretyakova A. I., Ananich T. S., Plavskaya L. G., Leusenka I. A., Sobchuk A. N., Sysov V. A., Dudinova O. N., Vodchits A. I., Khodasevich I. A., Orlovich V.A. Effect of continuous wave, quasi-continuous wave and pulsed laser radiation on functional characteristics of fish spermatozoa. *J Photochem Photobiol B: Biology.* 2021. Vol. 216, 112112.

Optical radiation acceptors in the visible region of the spectrum, determining light-induced changes in the functional characteristics of animal spermatozoa

V.Yu. Plavskii¹, A.I. Tretyakova¹, A.V. Mikulich¹, A.N. Sobchuk¹, A.I. Budevich², D.M. Bogdanovich, N.V. Barulin³, A.A. Romanenko¹, L.G. Plavskaya¹, T.S. Ananich¹, O.N. Dudinova¹, I.A. Leusenka¹

¹*B.I. Stepanov Institute of Physics of the NAS of Belarus, Minsk;
e-mail: v.plavskii@ifanbel.bas-net.by*

²*Research and Production Center of the National Academy of Sciences of Belarus for
Livestock Breeding, Zhodino;*

³*Belarusian State Agricultural Academy, Gorki*

The ability of low-intensity light to influence the functional characteristics of animal spermatozoa (mobility after activation by water, safety, fertilizing ability, etc.) has been shown. Metalless porphyrin (protoporphyrin IX) and flavin sensitizers were found in the semen of animals of various species (boars, goats, sturgeons), which can act as acceptors of optical radiation in the visible region of the spectrum, responsible for the implementation of the regulatory effect of light (photobiomodulation) by generating reactive oxygen species (ROS). ROS formation was confirmed by the chemiluminescent method. It was possible to identify porphyrin compounds present in semen in rather low concentrations (less than 10^{-8} M) thanks to a developed technique based on preliminary treatment of semen with hydrochloric acid and subsequent spectral-fluorescent analysis of the supernatant after centrifugation. It has been shown that such acid treatment, on the one hand, increases the fluorescence intensity of metal-free porphyrins, and on the other hand, causes quenching of the fluorescence of flavin compounds, which have an intense luminescence in native sperm, which makes it difficult to register weak fluorescence of the porphyrin component.

Keywords: laser radiation, LEDs, sperm cells, sperm motility, fertilizing ability, photo acceptors, reactive oxygen species