

УДК 616.64 – 091. 818: 537.5

ВЛИЯНИЕ МИЛЛИМЕТРОВОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ НА ПРОЦЕСС АПОПТОЗА МУЖСКИХ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК**Плосконос М.В.**

*ГБОУ ВПО Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России,
Астрахань, e-mail: ploskonoz@mail.ru;
Волжская государственная академия водного транспорта, Astrakhan*

Проведено исследование способности низкоинтенсивного электромагнитного излучения (ЭМИ) миллиметрового диапазона влиять на процесс апоптоза мужских половых клеток *in vitro*. Эякуляты от 28 фертильных мужчин после полного разжижения подвергались воздействию электромагнитного поля ($l = 7,1$ мм, $f = 42,194$ ГГц, $P = 0,1$ мВт·см²) в течение 30 мин. Контрольные образцы не подвергались влиянию ЭМИ. В качестве маркера апоптоза исследовалась экстернализация фосфатидилсерина (ФС) на внешнюю сторону клеточной мембраны сперматозоидов, путём окрашивания клеток аннексином-V (AnV) и йодистым пропидием (PI). Выявлено, что после воздействия на сперму низкоинтенсивного ЭМИ миллиметрового диапазона происходило статистически достоверное ($p < 0,01$) уменьшение процентного содержания аннексин-положительных сперматозоидов по сравнению с контролем, что свидетельствует об ингибирующем влиянии ЭМИ на процесс апоптоза мужских половых клеток *in vitro*.

Ключевые слова: электромагнитное излучение миллиметрового диапазона, апоптоз, сперматозонды

INFLUENCE OF MILLIMETER ELECTROMAGNETIC RADIATION OF LOW INTENSITY ON APOPTOSIS OF MALE GERM CELLS**Ploskonos M.V.**

*Astrakhan State Medical University Health Ministry of Russian Federation, Astrakhan,
e-mail: ploskonoz@mail.ru;
Volga State Academy of Water Transport, Astrakhan*

A study of the ability of low intensity electromagnetic radiation (EMR) millimeter wave influence on apoptosis of male germ cells *in vitro*. Ejaculates from 28 fertile males after complete dilution exposed to electromagnetic fields ($l = 7,1$ мм, $f = 42,194$ ГГц, $P = 0,1$ мВт·см²) for 30 min. Control samples were not subjected to the influence of electromagnetic radiation. As a marker of apoptosis was investigated externalization of phosphatidylserine (PS) on the outer side of the cell membrane of sperm cells by staining with Annexin-V (AnV) and propidium iodide (PI). It was revealed that after exposure to low intensity sperm EMR millimeter wave occurred statistically significant ($p < 0,01$) decrease in the percentage of annexin-positive sperm compared to the control, indicating that the inhibitory effect of EMP on apoptosis of male germ cells *in vitro*.

Keywords: electromagnetic radiation of a millimeter wave, apoptosis, sperm

Факторы окружающей среды, и в первую очередь факторы воздействия физической природы, например, электромагнитное излучение (ЭМИ), способны оказывать разнообразное влияние на состояние здоровья человека. В природе человек в основном сталкивается с низкочастотными и среднечастотными диапазонами воздействия ЭМИ. Так, например, микроволновое излучение используется в активно развиваемых в настоящее время телекоммуникационных системах: сотовых телефонах, устройствах Bluetooth, WiFi и WiMAX, поэтому изучение его влияния на биосистемы различного уровня организации является актуальной задачей [7].

Наибольший интерес для изучения представляет влияние микроволнового излучения низкой интенсивности и наиболее перспективным в этом направлении, малоисследованным и требующим дальнейшей

разработки, является изучение влияния микроволн диапазона КВЧ (миллиметровые волны) на функциональное состояние репродуктивной системы [2, 8].

Важная роль в мужской репродуктивной системе принадлежит процессу программируемой гибели клеток – апоптозу. Это нормальный физиологический процесс, в ходе которого происходит ряд морфологических и биохимических изменений [6]. Данных о способности низкоинтенсивного ЭМИ миллиметрового диапазона активировать или ингибировать процессы развития программируемой гибели мужских половых клеток (апоптоза) в доступной литературе не встречалось.

Цель исследования. Целью нашей работы стало исследование способности низкоинтенсивного ЭМИ миллиметрового диапазона влиять на процесс апоптоза мужских половых клеток *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Для проведения эксперимента были использованы эякуляты 28 фертильных мужчин – доноров в возрасте от 22 до 38 лет. Измерение показателей стандартной спермограммы (концентрации, подвижности, жизнеспособности и морфологии сперматозоидов) проводили согласно рекомендациям и нормативам ВОЗ [10].

Эякуляты после полного разжижения были разделены на две части, одну из которых использовали для контроля, а другую для опыта. Опытные образцы подвергались воздействию электромагнитного поля, имеющего следующие параметры: длина волны $l = 7,1$ мм, частота $f = 42,194$ ГГц, плотность мощности $P = 0,1$ мВт·см⁻².

Для создания поля с указанными параметрами был использован генератор монохроматических электромагнитных волн «Явь-1-7,1». Время экспозиции – 30 минут.

Далее и в контрольных, и в опытных образцах проводилось определение морфо-функциональных критериев качества спермы и маркера апоптоза – экстернализации фосфатидилсерина (ФС) на внешнюю сторону клеточной мембраны сперматозоидов, путём окрашивания клеток конъюгатом аннексина-V с флуорохромом (AnV-FITC) и йодистым пропидием (PI). Для этого сперматозоиды выделяли из образцов эякулятов методом простого отмывания от семенной плазмы фосфатно-солевым буфером pH=7,4 и окрашивали AnV и PI (Boehringer Mannheim, Germany), согласно инструкции изготовителя.

Различное насыщение клеток двумя красителями AnV и PI позволяет, используя флуоресцентную микроскопию, определить живые (AnV-/PI-) сперматозоиды, сперматозоиды с признаками апоптоза (AnV+/PI-) и нежизнеспособные клетки ((AnV+/PI+) и (AnV-/PI+)) [3, 4].

Микроскопические исследования проводили на флуоресцентном микроскопе «МИКРОМЕД 3 ЛЮМ» (Санкт-Петербург) под иммерсионным объективом ($\times 100$).

Полученные результаты исследований обработаны с использованием программы «Statistica 7.0». О достоверности различий судили по величине t-критерия Стьюдента. Данные представляли в виде $M \pm m$, различия между показателями считали достоверными при значении $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

При сравнительном анализе количества сперматозоидов с различными патологическими изменениями между контрольной и опытной группами достоверного отличия не выявлено ($p > 0,05$).

При расширенном цитологическом исследовании половых клеток фертильных мужчин не было выявлено достоверных изменений ($p > 0,05$) в количестве дефектов головки (аморфная, маленькая, суженная, круглая, двойная головка и др.), шейки («склоненная» шейка, тонкая средняя часть и др.) и хвоста сперматозоидов (2-хвостые формы, с коротким хвостом и др.) в опытных

образцах после воздействия низкоинтенсивного ЭМИ миллиметрового диапазона по сравнению с контрольными образцами.

Проведённый анализ двигательных характеристик сперматозоидов фертильных мужчин до и после воздействия низкоинтенсивного ЭМИ миллиметрового диапазона не выявил каких-либо достоверных различий ($p > 0,05$) в двигательной активности сперматозоидов до и после воздействия ЭМИ.

Анализ структурно-биохимических изменений, происходящих в клетке, связанных с нарушением симметрии клеточной мембраны и экстернализацией ФС, позволили сделать вывод о том, что после воздействия на сперму фертильных мужчин в течение 30 мин низкоинтенсивного ЭМИ миллиметрового диапазона происходило хоть и не большое, но статистически достоверное ($p < 0,01$) уменьшение процентного содержания (AnV+/PI-) – сперматозоидов в среднем на 2% по сравнению с контролем.

Учитывая различия контрольных величин, для усреднения и анализа полученных результатов [5] был введён показатель Индекс апоптоза (ИА) – отношение величины (AnV+/PI-) сперматозоидов после воздействия на сперму низкоинтенсивного ЭМИ миллиметрового диапазона к величине (AnV+/PI-) сперматозоидов в контроле (до воздействия ЭМИ):

$$IA = \frac{\text{Апоптоз опыт}}{\text{Апоптоз контроль}}$$

Значение данной величины больше 1 свидетельствует об индукции апоптоза сперматозоидов после воздействия на сперму низкоинтенсивного ЭМИ миллиметрового диапазона, а меньше 1 – об ингибирующем влиянии на процесс развития апоптоза *in vitro*. Величина ИА после 30 минутного воздействия низкоинтенсивного ЭМИ миллиметрового диапазона на сперму фертильных мужчин имела значение 0,8.

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что при использованном режиме воздействия микроволновое излучение не вызывает морфологических изменений и изменений в двигательной активности сперматозоидов фертильных мужчин. Однако, известно, что основными мишенями при воздействии миллиметровых волн на биологические объекты (в том числе, на организм человека) являются плазматические мембраны клеток [1]. Степень воздействия электромагнитных полей зависит от их характеристик, основными из которых являются индукция, частота и длительность воздействия.

Одним из самых ранних биохимических изменений, происходящих в клетке под-

вергшейся апоптозу, является нарушение симметрии клеточной мембраны и перемещение фосфатидилсерина (ФС) на её внешнюю сторону (экстернализация). Таким образом, ФС – фосфолипид, который в процессе апоптоза локализуется на клеточной поверхности и формирует один из специфических сигналов для распознавания апоптотической клетки [3, 4].

Миллиметровые волны, воздействуя на плазматические мембраны клеток, могут возбудить в них как в диэлектрических резонаторах акустоэлектрические колебания – колебания Фрёлиха. Вероятно, снижение экстернализации ФС на поверхность мембран сперматозоидов после воздействия низкоинтенсивного ЭМИ миллиметрового диапазона, проявляющееся в уменьшении количества (AnV+/PI-) сперматозоидов, можно объяснить стабилизацией мембран сперматозоидов, которая происходит благодаря явлению стохастического резонанса с собственными частотами биомембран сперматозоидов, что приводит к увеличению их адаптационных возможностей [9].

Заключение

Полученные данные об эффекте воздействия электромагнитного излучения миллиметрового диапазона, заключающемся в ингибирующем влиянии на процесс развития апоптоза мужских половых клеток *in vitro*, после дальнейшего расширенного исследования и анализа результатов, могут быть

использованы при подготовке спермы для вспомогательных репродуктивных технологий: искусственной инсеминации и экстракорпорального оплодотворения.

Список литературы

1. Бецкий О.В., Лебедева Н.Н., Котровская Т.И. Стохастический резонанс и проблема воздействия слабых сигналов на биологические объекты // Миллиметровые волны в биологии и медицине. – 2002. – № 3. – С. 3-11.
2. Кузнецова М.Г., Николаев А.А. Влияние микроволнового излучения низкой интенсивности на репродуктивную функцию самцов крыс // Вестник российской военно-медицинской академии. – 2008. – Т. 23, № 3. – С. 217-218.
3. Плосконос М.В. Методы определения апоптоза сперматозоидов (Обзор литературы) // Клини. лаб. диаг. – 2013. – № 4. – С. 3-8.
4. Плосконос М.В. Применение Эозина и йодистого пропидия для оценки жизнеспособности сперматозоидов человека // Клини. лаб. диаг. – 2014. – Т. 59, №11. – С. 22-25.
5. Плосконос М.В., Николаев А.А. Влияние полиаминов на апоптоз лимфоцитов периферической крови человека *in vitro* // Гемат. и трансфузиол. – 2010. – Т. 55, № 4. – С. 16-19.
6. Плосконос М.В., Николаев А.А. Апоптоз и мужская фертильность // Врач. – 2014. – № 3. – С. 23-25.
7. Скамрова Г.Б., Евстигнеева М.П., Лантушенко А.О. Влияние микроволнового излучения на частотах мобильной связи и сети WiMAX на проницаемость мембран клеток букального эпителия человека // Учёные записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2011. – Т. 24(63), № 4. – С. 282-291.
8. Субботина Т.И., Ткаченко В.Н., Яшин А.А. Влияние высокочастотных электромагнитных излучений на репродуктивную функцию // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – 2002. – Т.1, № 4. – С. 391-394.
9. Яшин А.А. Модели энергетических процессов в клетках организма при КВЧ облучении, использующие эффект стохастического резонанса // Вестник новых медицинских технологий. – 1999. – № 2. – С.18-24.
10. WHO laboratory manual for the examination of human sperm and semen-cervical mucus interaction. WHO, 4 edition. Cambridge: University Press 1999.