

ВЛИЯНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ФУЛЛЕРЕНОВ НА ПОДВИЖНОСТЬ МУЖСКИХ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК

Руднева Светлана Айвенговна

канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. лаборатории генетики нарушений репродукции ФГБНУ
«Медико-генетический научный центр», РФ, г. Москва

Ермолаева Светлана Алексеевна

науч. сотр. лаборатории генетики нарушений репродукции ФГБНУ «Медико-генетический
научный центр», РФ, г. Москва

Краевая Ольга Александровна

инженер лаборатории функциональных материалов для электроники и медицины, институт
проблем химической физики РАН, РФ, г. Черноголовка

Костюк Светлана Викторовна

д-р биол. наук, заведующая лабораторией молекулярной биологии ФГБНУ «Медико-
генетический научный центр», РФ, г. Москва

Умрюхин Павел Евгеньевич

д-р мед. наук, профессор кафедры нормальной физиологии ФГАОУ ВО ПМГМУ им. И.М.
Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), ст. науч. сотр. ФГБНУ НИИ
нормальной физиологии им. П.К. Анохина, РФ, г. Москва

Сергеева Василина Александровна

науч. сотр. лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «Медико-генетический научный
центр», РФ, г. Москва

Трошин Павел Анатольевич

канд. хим. наук, заведующий лабораторией функциональных материалов для электроники и
медицины, институт проблем химической физики РАН, РФ, г. Черноголовка доцент
Сколковского института науки и технологий, РФ, г. Москва

Черных Вячеслав Борисович

д-р мед. наук, заведующий лабораторией генетики нарушений репродукции ФГБНУ «Медико-
генетический научный центр», РФ, г. Москва

The Influence of modified water-soluble fullerenes on the mobility male sperm cells

Svetlana Rudneva

PhD, senior researcher of the laboratory genetics of reproduction disorders of Research Centre for Medical Genetics

Svetlana Ermolaeva

Researcher of the laboratory genetics of reproduction disorders of Research Centre for Medical Genetics

Ol'ga Kraevaya

Junior researcher at the laboratory of functional materials for electronics and medicine at the Institute for Problems of chemical Physics of RAS

Svetlana Kostyuk

Doctor of biological sciences, chief of the laboratory of molecular biology of Research Centre for Medical Genetics

Pavel Umryukhin

Professor of the normal physiology department of Sechenov University, senior researcher of P.K. Anokhin institute of normal physiology

Vasilina Sergeeva

Researcher of the laboratory of molecular biology of Research Centre for Medical Genetics

Pavel Troshin

PhD, chief of the laboratory of functional materials for electronics and medicine at the Institute for Problems of chemical Physics of RAS

Vyacheslav Chernykh

Chief of the laboratory genetics of reproduction disorders of Research Centre for Medical Genetics, doctor of medical sciences

Аннотация. Было изучено влияние модифицированных водорастворимых фуллеренов $C_{85}N_{10}H_{60}Cl_6$, $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$, $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ (в концентрациях 1 мг/мл, 0.1 мг/мл и 0.01 мг/мл, 1 мкг/мл и 0.1 мкг/мл) на подвижность сперматозоидов и изменение мембранного потенциала их митохондрий. Инкубация сперматозоидов с фуллеренами $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$, $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ сопровождается повышением их подвижности. Установлено, что чем ниже была концентрация указанных соединений, тем ярче

проявлялся эффект увеличения подвижности сперматозоидов. При инкубации сперматозоидов с модифицированным фуллереном $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ отмечалось увеличение средней интенсивности внутриклеточной флуоресценции маркера $I_{\text{MitoTracker Red}}$ более чем в 2 раза при концентрации 0.01 мг/мл и на 46% при концентрации 0.1 мг/мл. Так как инкубация сперматозоидов с фуллеренами $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$, $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ в концентрации ниже 1 мг/мл в течение недели сопровождается существенным повышением их подвижности, это указывают на отсутствие цитотоксичности этих соединений и на возможность их использования в качестве стимуляторов активности митохондрий сперматозоидов. Установлено, что модифицированный водорастворимый фуллерен $C_{85}N_{10}H_{60}C_{16}$ является крайне токсичным для сперматозоидов.

Abstract. The influence of modified water-soluble fullerenes $C_{85}N_{10}H_{60}Cl_6$, $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$, $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ (in concentrations of 1 mg/ml, 0.1 mg/ml and 0.01 mg/ml, 1 μ g/ml and 0.1 μ g/ml) on sperm motility, as well as on the changes in the membrane potential of sperm cell's mitochondria during their incubation with these compounds was studied. It was shown that the incubation of sperm cells with fullerenes $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$, $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ is accompanied by an increase in their mobility. The lower was the concentration of these compounds, the more was the increase of sperm cells motility. It could indicate a lack of cytotoxicity of these compounds as well as the possibility of their use as stimulants of the mitochondria activity of the sperm cells. It was also found that fullerene $C_{85}N_{10}H_{60}C_{16}$ is extremely toxic to sperm cells.

Ключевые слова: фуллерены; сперматозоиды; митохондрии; подвижность.

Keywords: fullerenes; male sperm cells; mitochondria; mobility.

Расширенный реферат. The development of nanotechnology leads to the emergence of new forms of substances. Currently, fullerenes occupy a special place in the nanoindustry. Many experts consider them as a very promising material for medicine and biotechnology. The search for new biologically active compounds with antioxidant and radioprotective properties has led to the discovery of water-soluble fullerenes. The biological properties of this category of fullerenes and their functional derivatives are studied and already used to create new drugs and biomaterials.

The influence of modified water-soluble fullerenes $C_{85}N_{10}H_{60}Cl_6$, $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$, $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ (in concentrations of 1 mg/ml, 0.1 mg/ml and 0.01 mg/ml, 1 μ g/ml and 0.1 μ g/ml) on sperm motility, as

well as on the changes in the membrane potential of sperm cell's mitochondria during their incubation with these compounds was studied.

It was shown that the incubation of sperm cells with modified water-soluble fullerenes $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$, $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ in these concentrations is accompanied by an increase in their mobility. It was also found that the lower is the concentration of these compounds, the more is the increase of sperm cells motility.

It was shown that during the incubation of sperm cells with the modified fullerene $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ there was an increase in the average intensity of intracellular fluorescence of I MitoTracker Red more than 2 times (by 120%) at a concentration of 0.01 mg/ml and by 46% at a concentration of 0.1 mg/ml. It was shown that the lower was the concentration of $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ during sperm cells incubation the more was the effect of transmembrane mitochondria potential ($\Delta\Psi_m$) increase. Similar results were found after one hour of incubation the mobile fraction of sperm cells with a modified fullerene $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$. However, the increase in the average intensity of intracellular fluorescence of the I_{MitoTrackerRed} marker was not so pronounced, although it also depended on the concentration of fullerene.

Since the incubation of sperm cells with modified water-soluble fullerenes $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$, $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ at a concentration below 1mg/ml for one week is accompanied by a significant increase of their mobility, it could indicate a lack of cytotoxicity of these compounds at that concentration as well as the possibility of their use as stimulant of the mitochondria activity of the sperm cells.

In the study it was found that modified water-soluble fullerene $C_{85}N_{10}H_{60}C_{16}$ is extremely toxic to sperm cells. It was shown that the higher is the concentration of modified fullerene during incubation, the stronger is its toxic effect. The reduction of the sperm cells mitochondria transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) during the incubation with $C_{85}N_{10}H_{60}C_{16}$ is consistent with the previously obtained data about the changes in sperm cells motility. Thus, the incubation of male sperm cells with this compound at a concentration of 1 μ g/ml and above leads to total immobilization and loss of viability.

Введение. Развитие нанотехнологий приводит к появлению новых форм веществ. В настоящее время фуллерены занимают особое место в nanoиндустрии. Многие специалисты рассматривают их как весьма перспективный материал для использования в медицине и биотехнологии. Широко известна противовирусная активность производных фуллеренов [1-4]. В работе [1] авторами показано, что производные фуллеренов способны размещаться внутри гидрофобной полости ВИЧ-протеазы, затрудняя доступ субстратов к каталитическому сайту фермента. Р.А. Котельниковой и соавторами в работе [5] показана способность аминокислотных производных фуллеренов ингибировать герпес-вирусную инфекцию. Кроме того, группой ученых были разработаны производные фуллеренов, способные доставлять генетический материал при лечении генетических заболеваний [6]. Связываясь с плазмидой, они переносили ее в клетки с эффективностью, сопоставимой с коммерческими реагентами.

Молекула фуллерена представляет собой замкнутый симметричный углеродный каркас с формой, близкой к сферической. Начиная с 1985 года, после открытия фуллеренов, было синтезировано значительное число их модифицированных производных. Поиск среди них новых биологически-активных соединений с антиоксидантными, радиопротекторными свойствами привел к появлению водорастворимых форм фуллеренов. В настоящее время биологические свойства данной категории фуллеренов и их функциональных производных всесторонне изучаются и используются с целью создания на их основе новых лекарственных средств и биоматериалов [7, 8]. В связи с вышеизложенным, мы считаем актуальным исследование влияния различных модификаций фуллеренов $C_{85}N_{10}H_{60}Cl_6$, $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$, $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ (рис. 1) на подвижность сперматозоидов. В наши задачи также входило исследование изменений мембранного потенциала митохондрий сперматозоидов в процессе их инкубации с данными соединениями.

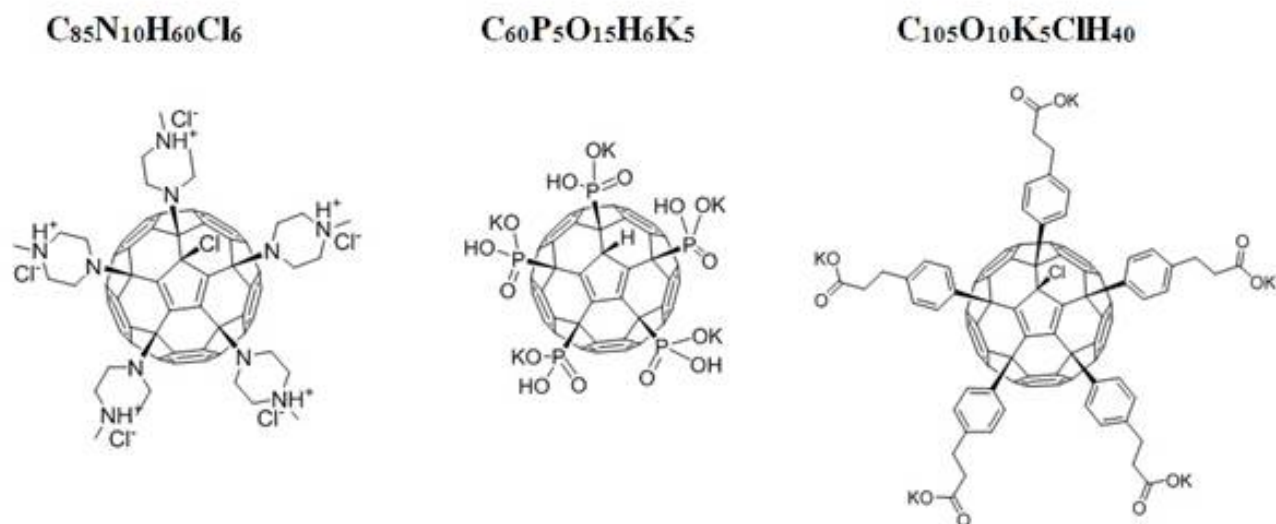


Рисунок 1. Химические формулы используемых модификаций фуллеренов

Материалы и методы. Оценку параметров эякулята осуществляли по стандартам ВОЗ-2010 [9]. Сперматозоиды с поврежденной мембраной выявляли с использованием 1% водного раствора эозина. Модификации фуллеренов разводили до конечной концентрации в эякуляте – 1 мг; 0.1 мг; 0.01 мг/мл; 1 мкг/мл и 0.1 мкг/мл. Инкубацию проводили при температуре 20°C.

Влияние модифицированных фуллеренов на состояние митохондрий сперматозоидов исследовали по изменению трансмембранного потенциала митохондрий ($\Delta\Psi_m$), используя потенциал-чувствительный маркер МитоТрекер Красный (MitoTracker Red, Molecular Probes, США) путем определения средней интенсивности флуоресценции на проточном цитофлуориметре. Исследуемые образцы, согласно методике изготовителя, инкубировали в стандартных условиях (+37°C) в течение 0.5 часа с MitoTracker Red в конечной концентрации 0.5 мМ, затем образцы дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ), далее суспензию центрифугировали 10 минут при 500g, осадок ресуспендировали в ФСБ и анализировали на проточном цитофлуориметре «Partec».

Последующая обработка полученных результатов производилась с использованием программного обеспечения MS Excel. Полученные результаты исследований обработаны с учетом стандартных методик вариационной статистики. Данные представлены в виде $M \pm m$, различия между показателями считали достоверными при значении $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение. Влияние модифицированных фуллеренов $C_{85}N_{10}H_{60}Cl_6$, $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$, $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ на подвижность сперматозоидов.

Было изучено влияние модифицированных водорастворимых фуллеренов (в концентрациях 1 мг/мл, 0.1 мг/мл и 0.01 мг/мл) на подвижность сперматозоидов. Препараты подбирались с близкими значениями подвижности, чтобы уменьшить разброс показаний и инкубировались в течение 3 часов при температуре 20°. Показано, что в данных условиях (при различных концентрациях исследуемых веществ и времени инкубации с ними) соединения $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$, $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$ способствовали увеличению подвижности сперматозоидов по сравнению с контролем. Максимальное увеличение наблюдалось при концентрациях $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ – 0.1 мг/мл и времени инкубации 3 часа – на 71%. Существенное увеличение подвижности сперматозоидов – на 60% по сравнению с контролем было отмечено также при концентрации $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$ - 0.1 мг/мл и времени инкубации 3 часа. Инкубация с модифицированным фуллереном $C_{85}N_{10}H_{60}Cl_6$, напротив, способствовала полному обездвиживанию сперматозоидов при концентрациях 1 мг/мл и 0.1 мг/мл (табл.1). При этом важно подчеркнуть, что падение подвижности сперматозоидов практически до нуля происходило уже в течение первого часа инкубации с исследуемым соединением, и к 3 часам

приводило к полному обездвиживанию сперматозоидов.

Таблица 1.

Подвижность сперматозоидов при инкубации с модифицированным фуллереном $C_{85}N_{10}H_{60}Cl_6$ в разных концентрациях

Время инкубации	Концентрация фуллерена $C_{85}N_{10}H_{60}Cl_6$			
	Контроль	0.1 мг/мл	0.1 мг/мл	1 мг/мл
PR (активн. подв.), 1 час	29±4	17±4	1±0,7	0
PR+NR (общ. подв.), 1 час	40±5	30±5	9±4	0
PR (активн. подв.), 3 часа	22±4	7±3	0	0
PR+NR (общ. подв.), 3 часа	34±5	22±4	3±2	0
N	10	10	10	10

В дальнейшем, были проведены более детальные эксперименты, в которых концентрации исследуемых соединений были уменьшены, а время инкубации сперматозоидов с ними увеличено. Для этого предварительно была выделена подвижная фракция сперматозоидов согласно протоколу фирмы изготовителя (ПанЭко, Среда ЭКО 1 "Спермопреп"). Препараты также подбирались с близкими значениями подвижности, чтобы уменьшить разброс показаний.

Было показано, что при инкубации подвижной фракции сперматозоидов с исследуемым веществом $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ в концентрации 0.1 мкг/мл наблюдалось наибольшее увеличение подвижности сперматозоидов по сравнению с контролем в течение всех трех дней (табл. 2). Увеличение подвижности сперматозоидов по сравнению с контролем наблюдалось при всех временных интервалах от 3 ч до 3 суток на 43 % - 60% соответственно (табл. 2). Однако, при концентрации $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ 0.01 мг/мл, мы наблюдали увеличение подвижности сперматозоидов по сравнению с контролем в течении первых суток, но в дальнейшем (через 2 дня и более) все сперматозоиды переставали двигаться. При более высоких концентрациях $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ уже через сутки все сперматозоиды были обездвижены (табл. 2).

Аналогичные результаты были получены и при инкубации подвижной фракции сперматозоидов с $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$. Было показано, что при инкубации данного вещества с подвижной фракцией сперматозоидов наблюдалось существенное увеличение подвижности сперматозоидов по сравнению с контролем. Так, максимальное увеличение подвижности сперматозоидов по сравнению с контролем наблюдалось при концентрации $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$ 1мкг/мл через 3 часа - на 73%, и через 3 суток на 60% (табл. 3).

Таблица 2.

Изменение подвижности сперматозоидов при инкубации с фуллереном $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ в разных концентрациях

Время инкубации	Концентрация фуллерена $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$			
	Контроль	0.1 мг/мл	0.01 мг/мл	0.1 мкг/мл
PR (активн. подв.), 3 часа	54±4	61±6	71±6	77±7
PR (активн. подв.), 1 день	52±5	0	58±4	76±8
PR (активн. подв.), 2 дня	50±4	0	0	76±6
PR (активн. подв.), 3 дня	46±4	0	0	74±4
N число эксп.	3	3	3	3

Таблица 3.

Изменение подвижности сперматозоидов при инкубации с фуллереном $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$ в разных концентрациях

Время инкубации	Концентрация фуллерена $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$			
	Контроль	0.1 мг/мл	0.01 мг/мл	1 мкг/мл
PR (активн. подв.), 3 часа	45±5	58±6	47±6	78±8
PR (активн. подв.), 1 день	44±5	41±5	46±6	73±6
PR (активн. подв.), 2 дня	43±4	0	46±5	66±5
PR (активн. подв.), 3 дня	40±4	0	42±5	64±6
N Число эксп.	3	3	3	3

Чтобы проверить не проявляют ли модифицированные фуллерены $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$ и $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ в концентрации 1 мкг/мл в какой-то временной точке токсичных свойств по отношению к сперматозоидам мы оценили как меняется подвижность сперматозоидов, инкубированных с $C_{85}N_{10}H_{60}Cl_6$, $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$, $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ в данной концентрации в течение 7 дней. Было показано (табл. 4), что инкубация подвижной фракции сперматозоидов как с $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ так и $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$ при концентрации 1 мкг/мл способствовала увеличению подвижности сперматозоидов по сравнению с контролем в течение всей недели. Максимальное увеличение подвижности сперматозоидов (в 2 раза) наблюдалось через 3 суток инкубации с $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$.

Модифицированный фуллерен $C_{85}N_{10}H_{60}Cl_6$, напротив, был токсичен для сперматозоидов даже в концентрации 1 мкг/мл. Что проявлялось как в обездвиживании сперматозоидов, так и в нарушении целостности их мембран (табл. 5). Через сутки инкубации с $C_{85}N_{10}H_{60}Cl_6$ в концентрации 1 мкг/мл все сперматозоиды были обездвижены и нежизнеспособны.

Таблица 4.

Изменение подвижности сперматозоидов при инкубации с $C_{85}N_{10}H_{60}Cl_6$, $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$, $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ в концентрации 1 мкг/мл

Время инкубации	Контроль	1 мкг/мл $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$	1 мкг/мл $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$	1 мкг/мл $C_{85}N_{10}H_{60}Cl_6$
PR (активн. подв.), через 1 день	44±5	67±6	74±6	0
PR (активн. подв.), через 2 дня	38±4	56±5	63±5	0
PR (активн. подв.), через 3 дня	28±4	38±5	56±5	0
PR (активн. подв.), через неделю	3±0,6	3±0,6	5±0,7	0
N Число эксп.	5	5	5	5

Влияние модифицированных фуллеренов $C_{85}N_{10}H_{60}Cl_6$, $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$, $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ на состояние митохондрий сперматозоидов. Подвижность сперматозоидов зависит от большого числа разнообразных факторов, имеющих сложные механизмы регуляции.

Таблица 5.

Жизнеспособность сперматозоидов при инкубации с модифицированными фуллеренами $C_{85}N_{10}H_{60}Cl_6$, $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$, $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ в концентрации 1 мкг/мл

Время инкубации	Контроль	1 мкг/мл	1 мкг/мл	1 мкг/мл
-----------------	----------	----------	----------	----------

		$C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}O$	$C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$	$C_{85}N_{10}H_{60}Cl_6$
через 1 день	98 ± 2	98 ± 2	94 ± 4	0
через 2 дня	84 ± 4	89 ± 5	88 ± 5	0
через 3 дня	78 ± 5	85 ± 5	78 ± 5	0
через неделю	71 ± 4	63 ± 5	69 ± 4	0
N Число эксп.	5	5	5	5

Способность к перемещению у них развивается по мере созревания в придатке яичка – эпидидимисе и зависит от нормальной работы механизмов, управляющих жгутиком, а также наличия как внутренних, так и внешних энергетических ресурсов. Как и любая другая клетка, сперматозоид использует энергию АТФ для обеспечения жизнедеятельности: работы ионных каналов, подвижности, и др. В митохондриальной части жгутика происходит окислительное фосфорилирование, считается, что образованные в митохондриальной части жгутика молекулы АТФ используются для поддержания подвижности сперматозоидов [10].

Влияние фуллеренов на состояние митохондрий сперматозоидов исследовали по изменению трансмембранного потенциала митохондрий ($\Delta\Psi_m$) используя потенциал-чувствительный маркер MitoTracker Red путем определения средней интенсивности флуоресценции на проточном цитофлуориметре. В ходе исследований установлено, что через час инкубации сперматозоидов с модифицированным фуллереном $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ отмечалось увеличение средней интенсивности внутриклеточной флуоресценции маркера ($I_{\text{MitoTracker Red}} / \text{кл, усл.ед.}$), более чем в 2 раза (на 120%), при концентрации 0.01 мг/мл и на 46% при концентрации 0.1 мг/мл (рис. 2). При концентрации 1 мг/мл средняя интенсивность внутриклеточной флуоресценции маркера $I_{\text{MitoTracker Red}}$ была практически такой же как в контроле. То есть, в ходе экспериментов было показано, что чем ниже была концентрация $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$, с которым инкубировали сперматозоиды, тем ярче проявлялся эффект увеличения трансмембранного потенциала митохондрий ($\Delta\Psi_m$). Что, впрочем, согласуется с данными по изменению подвижности сперматозоидов в ходе инкубации с фуллереном $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$.

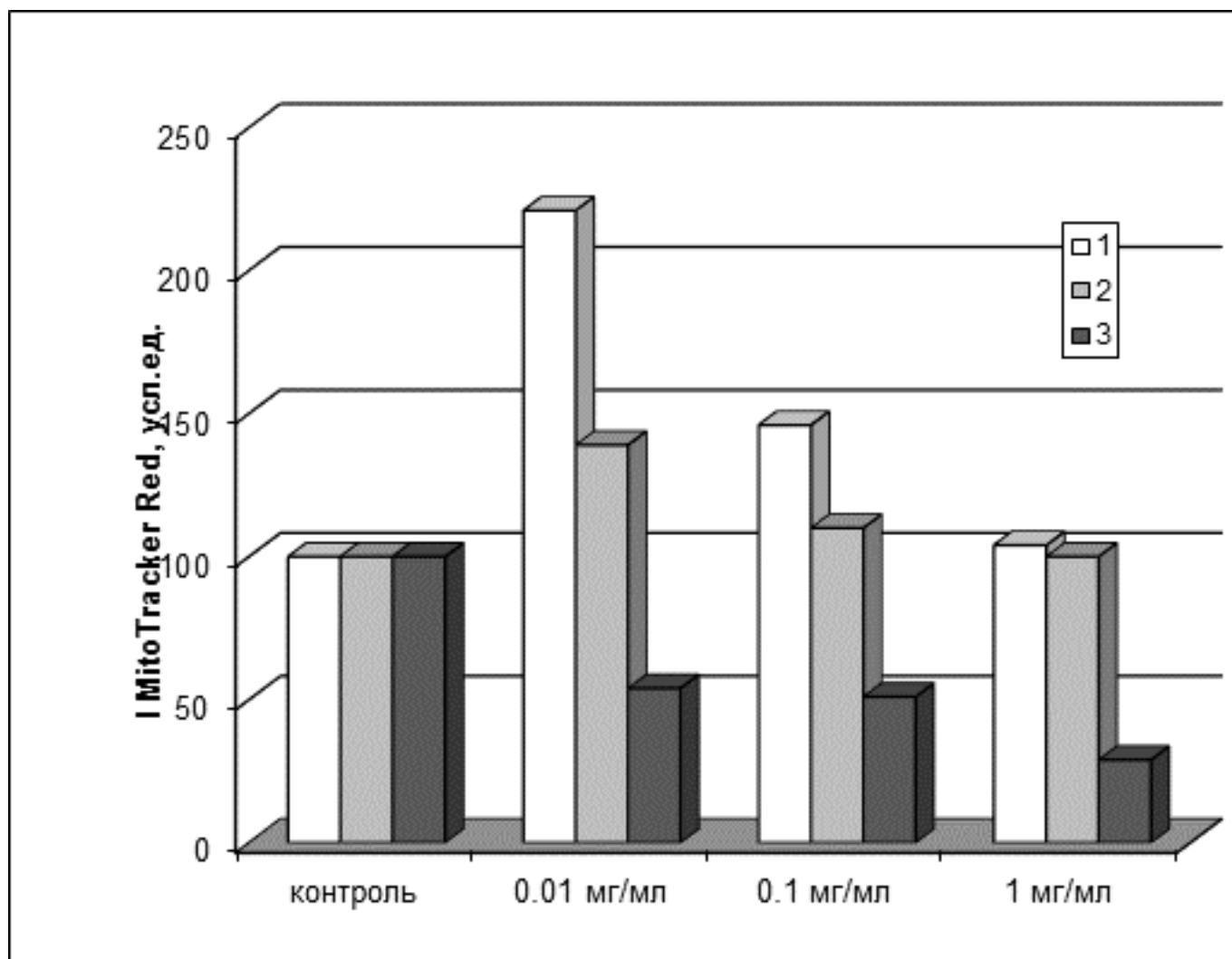


Рисунок 2. Изменение относительной интенсивности флуоресценции MitoTracker Red в сперматозоидах через час инкубации с модифицированными фуллеренами: 1 - C₁₀₅O₁₀K₅ClH₄₀, 2 - C₆₀P₅O₁₅H₆K₅, 3 - C₈₅N₁₀H₆₀Cl₆, в различных концентрациях

Аналогичные данные были получены нами и после часа инкубации подвижной фракции сперматозоидов с модифицированным фуллереном C₆₀P₅O₁₅H₆K₅. Однако, увеличение средней интенсивности внутриклеточной флуоресценции маркера I_{MitoTrackerRed} не носило столь выраженный характер, хотя также зависело от концентрации фуллерена. То есть, чем ниже была концентрация C₆₀P₅O₁₅H₆K₅, с которым инкубировали сперматозоиды, тем ярче проявлялся эффект увеличения трансмембранного потенциала митохондрий (ΔΨ_m) (рис. 2). Что также согласуется с данными по изменению подвижности сперматозоидов в ходе инкубации с данным модифицированным фуллереном.

Кроме того, в ходе исследований было установлено, что через час инкубации сперматозоидов с модифицированным фуллереном C₈₅N₁₀H₆₀Cl₆ в концентрации 0.01 мг/мл, отмечалось уменьшение средней интенсивности внутриклеточной флуоресценции маркера (MitoTracker Red /кл, усл.ед.), на 46%, при концентрации 0,1 мг/мл и на 71% при концентрации 1 мг/мл (рис. 2). То есть, в ходе экспериментов было показано, что чем выше была концентрация модифицированного фуллерена, с которым инкубировали сперматозоиды, тем сильнее проявлялось его токсическое воздействие. Эффект уменьшения трансмембранного потенциала митохондрий (ΔΨ_m) также согласуется с полученными нами ранее данными по изменению подвижности сперматозоидов в ходе инкубации с модифицированным фуллереном C₈₅N₁₀H₆₀Cl₆.

В дальнейшем, нами были проведены более детальные эксперименты с модифицированными

фуллеренами $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$, $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$. Мы использовали более низкие концентрации данных веществ – 1 мкг/мл и увеличили время инкубации сперматозоидов с ними. Для этого предварительно была выделена подвижная фракция сперматозоидов, согласно протоколу фирмы изготовителя (ПанЭко, Среда ЭКО 1 "Спермопреп").

В ходе исследований установлено, что при инкубации подвижной фракции сперматозоидов с модифицированным фуллереном $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$, в концентрации 1 мкг/мл отмечалось увеличение средней интенсивности внутриклеточной флуоресценции маркера ($I_{\text{MitoTracker Red}}$, усл.ед.) на 73% через 4 часа инкубации, и на 50% через 8 часов инкубации по сравнению с контролем, через 24 часа средняя интенсивность внутриклеточной флуоресценции маркера ($I_{\text{MitoTracker Red}}$, усл.ед.) была практически такой же как в контроле (табл. 6, рис. 3). Эти данные свидетельствуют о существенном увеличении трансмембранного потенциала митохондрий ($\Delta\Psi_m$) в сперматозоидах, то есть о большей эффективности работы митохондрий под влиянием фуллерена $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ в течении первых 8 часов инкубации, что согласуется с данными по изменению подвижности сперматозоидов. Однако, увеличение подвижности сперматозоидов при данной концентрации фуллерена мы наблюдали в течение всей недели, тогда как увеличение трансмембранного потенциала носило обратимый характер и наблюдалось только в течение первых 8 часов.

Таблица 6.

Динамика средней интенсивности флуоресценции $I_{\text{MitoTracker Red}}$ в сперматозоидах при инкубации с фуллеренами $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$, $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ в концентрации 1 мкг/мл

І фл.	Контроль	1мкг/мл $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$	1мкг/мл $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$
Через 4 часа	0.34 ± 0.04	0.59 ± 0.04	$0.57 \pm 0,07$
Через 8 часов	0.30 ± 0.03	0.5 ± 0.06	0.35 ± 0.04
Через 24 часа	0.23 ± 0.03	0.24 ± 0.05	0.26 ± 0.03
N Число эксп.	5	5	5

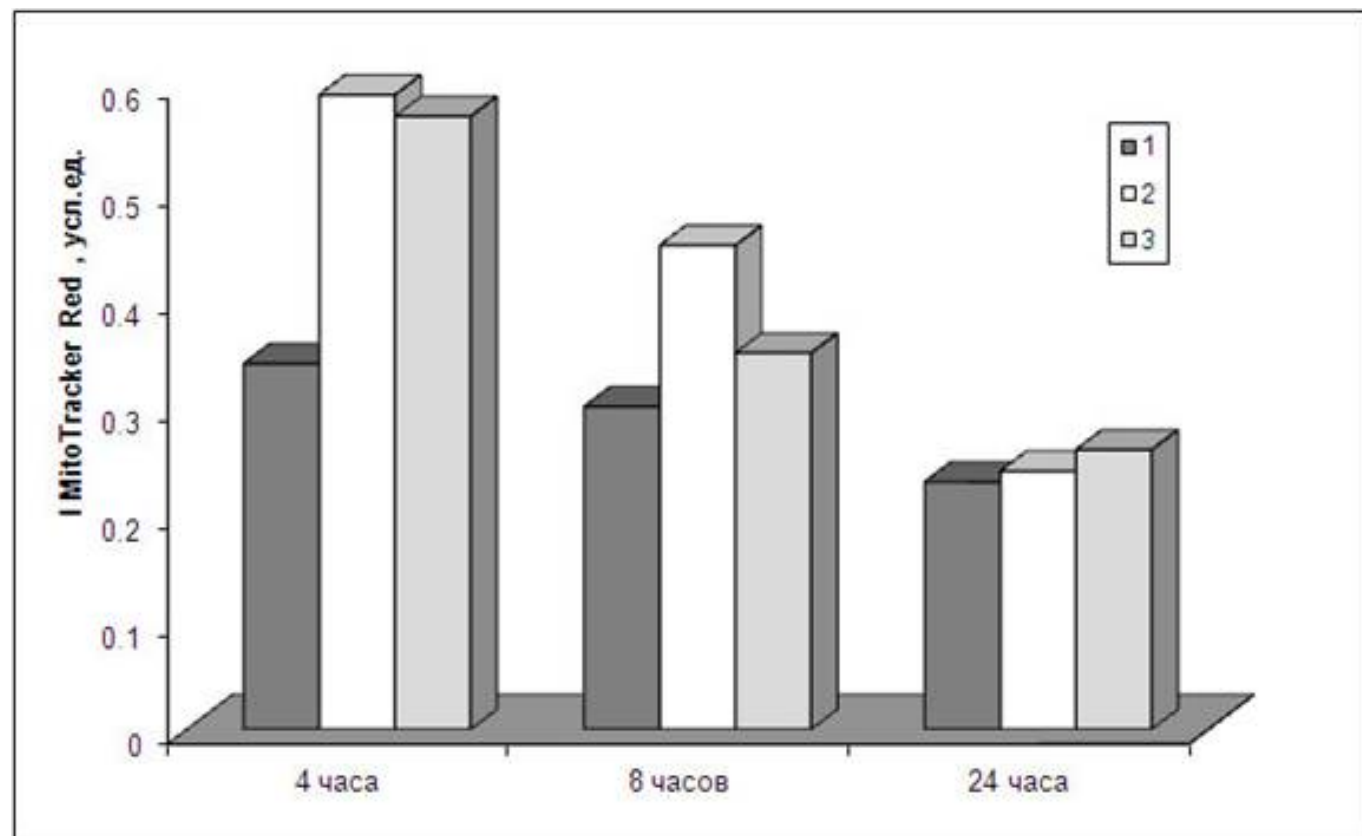


Рисунок 3. Изменение средней интенсивности флуоресценции $I_{\text{MitoTracker Red}}$ в

сперматозоидах в процессе инкубации с модифицированными фуллеренами в концентрации 1 мкг/мл. 1 - контроль, 2 - $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$, 3 - $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$

Аналогичные результаты были получены нами и при инкубации сперматозоидов с модифицированным фуллереном $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$ в концентрации 1 мкг/мл. Отмечалось существенное увеличение средней интенсивности внутриклеточной флуоресценции маркера ($I_{\text{MitoTracker Red}}$, усл.ед.), на 68% через 4 часа инкубации и на 17% через 8 часов инкубации, через 24 часа средняя интенсивность внутриклеточной флуоресценции маркера ($I_{\text{MitoTracker Red}}$, усл.ед.) была практически такой же как в контроле (табл. 6). Эти данные также свидетельствуют о существенном увеличении трансмембранного потенциала митохондрий ($\Delta\Psi_m$) в сперматозоидах в течении первых 4 часов, то есть о большей эффективности работы митохондрий при инкубации с модифицированным фуллереном $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$, что также согласуется с данными по изменению подвижности сперматозоидов. Однако, как и при инкубации с $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ увеличение подвижности сперматозоидов при данной концентрации $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$ наблюдалось в течение всей недели, тогда как увеличение трансмембранного потенциала носило обратимый характер и наблюдалось только в течение первых 4 часов.

Заключение. Показано, что инкубация сперматозоидов в течение недели с модифицированными водорастворимыми фуллеренами $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$, $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ в концентрации ниже 1 мг/мл сопровождается повышением их подвижности. Полученные результаты указывают на отсутствие цитотоксичности модифицированных водорастворимыми фуллеренов $C_{60}P_5O_{15}H_6K_5$, $C_{105}O_{10}K_5ClH_{40}$ в данной концентрации, а также на возможность их использования в качестве стимуляторов активности митохондрий сперматозоидов. Показано, что модифицированный водорастворимый фуллерен $C_{85}N_{10}H_{60}C_{16}$ является крайне токсичным по отношению к сперматозоидам. Инкубация мужских половых клеток с данным соединением в концентрации 1 мкг/мл и выше приводит к тотальному их обездвиживанию и потери сперматозоидами жизнеспособности.

Список литературы:

1. Friedman S.H., De Camp D.L., Sijbesma R.P., Srdanov G., Wudl F., Kenyon G.L. Inhibition of the HIV-1 protease by fullerene derivatives: Model building studies and experimental verification // J.Am.Chem.Soc.1993.V.115. №15. P. 6506-6509.
2. Schuster D.I., Wilson S.R., Schinazi R.F. Anti-human immunodeficiency virus activity and cytotoxicity of derivatized buckminsterfullerenes // Bioorg. Med. Chem. Lett.1996.V.6.№. 11.P. 1253-1256.
3. Nakamura E., Tokuyama H., Yamago Sh., Shiraki T., Sugiura Y. Biological Activity of Water-Soluble Fullerenes. Structural Dependence of DNA Cleavage, Cytotoxicity and Enzyme Inhibitory Activities Including HIV-Protease Inhibition // Bull.Chem.Soc.Jpn. 1996. V. 69. № 8. P. 2143-2151.
4. Marcorin G.L., Da Ros T., Castellano S., Stefancich G., Bonin I., Miertus S., Prato M. Design and synthesis of novel [60]fullerene derivatives as potential HIV aspartic protease inhibitors // Org. Lett. 2000. V. 2, № 25. P. 3955-3958.
5. Котельникова Р.А., Файнгольд И.И., Полетаева Д.А., Мищенко Д.В., Романова В.С., Штолько В.Н., Богданов Г.Н., Рыбкин А.Ю., Фрог Е.С., Смолина А.В., Куц А.В., Федорова Н.Е., Котельников А.И. Антиоксидантные свойства водорастворимых аминокислотных производных фуллеренов и их роль в ингибировании герпесвирусной инфекции // Известия Академии наук. Сер. Химическая. 2011. № 6. С. 1146-1150.
6. Nakamura E., Isobe H., Tomita N., Jinno Sh., Okayama H., Sawamura M. Functionalized Fullerene as an Artificial Vector for Transfection // Angew. Chem. Int. Ed.2000.V. 39. № 23. P. 4254-4257.

7. Troshina O.A., Troshin P.A., Peregudov A.S., Kozlovskiy V.I., Balzarini J., Lyubovskaya R.N. Chlorofullerene C₆₀Cl₁₆: a precursor for straightforward preparation of highly water-soluble polycarboxylic fullerene derivatives active against HIV // Org. Biomol. Chem. 2007. V. 5. № 17. P. 2783–2791.
8. Евдокимов В.В., Коршунова Е.С., Туровецкий В.Б., Шайтан К.В., Рубин А.Б. Влияние фуллерена C₆₀(OH)₂₅ на сперматозоиды человека // Андрология и генитальная хирургия. 2010. № 3. С. 27–28.
9. Курило Л.Ф. Руководство ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью. – 4-е изд. М.: «МедПресс». 2001.
10. Ford W.C. L. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round // Human Reproduction Update. 2006. V. 12. № 3. P. 269–274.