

KINETYKA TRANSPORTU SUBPOPULACJI PLEMNİKÓW IN VITRO W ZMIENNYM POLU MAGNETYCZNYM Z ZAKRESU ELF

Feliks Jaroszyk, Honorata Nawrocka, Wojciech Warchoń, Dariusz Włodarczyk

Katedra Biofizyki, Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Fredry 10. 61-701 Poznań

Streszczenie

Badano wpływ zmiennego pola magnetycznego typu M_1P_2 i M_1P_3 , generowanego w zakresie ELF (extremely low frequency, 0–300 Hz) przez urządzenie Viofor JPS, na kinetykę transportu subpopulacji plemników w stanie in vitro. Porównano kinetykę transportu subpopulacji plemników poddawanych działaniu pól magnetycznych z kinetyką transportu subpopulacji plemników w stanie in vitro stanowiących grupę kontrolną, niepoddaną działaniu pól magnetycznych.

Abstract

Sperm motility in vitro under the influence of variable magnetic field in the range of ELF

The influence of magnetic field on sperm subpopulation motility in vitro was examined. The magnetic field type M_1P_2 or M_1P_3 was generated by Viofor JPS apparatus in the range of ELF (extremely low frequency, 0–300 Hz). The results were compared with control subpopulation not exposed to the magnetic field.

Słowa kluczowe: magnetostymulacja, kinetyka transportu plemników

Key words: magnetostimulation, sperm mobility

Wpłynęło 07.05.2003, wersja poprawiona 01.03.2004, zaakceptowano do druku 01.07.2004

1. Wstęp

Znany jest związek pomiędzy ruchliwością plemników a ich zdolnością do zapłodnienia [1, 2]. Precyzyjna ocena indywidualnego ruchu plemników pomocna jest w diagnostyce i prognozowaniu męskiej bezpłodności [2, 3]. Znajomość fizjologii zapłodnienia pozwala stwierdzić, że niektóre jego etapy są ściśle uzależnione od aktywności ruchowej męskich gamet. Penetracja przez śluz szyjkowy i osiągnięcie miejsca syngamii w określonym czasie koreluje z liczbą plemników o szybkim ruchu progresywnym oraz dodatkowo z liczbą plemników o prawidłowej morfologii [1, 3]. Można stwierdzić, że najważniejszym parametrem w ocenie przydatności plemników do zapłodnienia jest ich ruch liniowy [3]. Wartości poszczególnych parametrów ruchu są zależne od „ładunku energetycznego” plemników. Ten zaś zależy od równowagi pomiędzy reakcjami wykorzystującymi ATP a szlakami metabolicznymi syntezy tego związku [3].

2. Materiał i metoda

Przedmiotem badania było nasienie pochodzące od mężczyzn z normospermią lub oligospermią I stopnia, co oznacza, że powyżej 40% plemników posiada pra-

widłową budowę i w 1 cm^3 znajduje się powyżej 10 mln komórek, wykazujących właściwości ruchu [1].

Badania wykonywano po 0,5 h od momentu oddania nasienia. Uzyskany materiał każdorazowo dzielono na dwie części i umieszczano w komorach o wysokości $25\text{ }\mu\text{m}$ [2, 4–6]. Jedną z komór poddawano działaniu określonego zmiennego pola magnetycznego, natomiast druga znajdowała się poza obszarem działania tego pola i stanowiła próbkę kontrolną. Wykonano cztery typy stymulacji wykorzystując magnetostymulator VIOFOR JPS (przy zastosowaniu programów M_1P_2 i M_1P_3):

- stymulacja przy użyciu programu M_1P_2 w czasie 0,5 h (4 przypadki),
- stymulacja przy użyciu programu M_1P_2 w czasie 1 h (3 przypadki),
- stymulacja przy użyciu programu M_1P_3 w czasie 0,5 h (6 przypadków),
- stymulacja przy użyciu programu M_1P_3 w czasie 1 h (4 przypadki).

W aparaturze do badań oprócz generatora zmiennego pola magnetycznego Viofor JPS znajdowała się cewka Helmholtza, w której umieszczony był

preparat. Po odpowiednim czasie stymulacji (0,5 h lub 1 h) preparat umieszczano na półce mikroskopu połączonego z kamerą i komputerem. Każdorazowo dokonywano komputerowej rejestracji obrazu mikroskopowego poruszających się plemników. Każdy zarejestrowany fragment obszaru analizy składał się z 51 klatek zarejestrowanych w czasie 2,04 s (obraz rejestrowano z szybkością 25 klatek/s). Aby dokonać analizy poszczególnych sekwencji, należało w pierwszej kolejności wykonać rekonstrukcję trajektorii ruchu plemników. Czynność ta została podzielona na dwie części: detekcja kinetyki transportu plemników oraz połączenie w przestrzeni kolejnych obrazów sekwencji [2, 4–6]. Na tej podstawie dla każdego rozważanego plemnika uzyskano trajektorię ruchu i obliczono parametry kinetyki: prędkość liniową (VSL, straight-line velocity), prędkość krzywoliniową (VCL, curvilinear velocity, track velocity), częstotliwość uderzeń wita (CBF, beat cross frequency, ciliary beat frequency), rozrzut główki względem kierunku ruchu (LHD, lateral head displacement) oraz niejednorodność ruchu postępowego (HHD, horizontal head displacement) [4, 6].

Na podstawie rozkładu VSL i w oparciu o sprawdzenie normalności tego parametru stwierdzono, że w badanych nasieniach występują grupy (subpopulacje) Tabela 1a

Subpopulacja I		0,5h M ₁ P ₂	
Typ	Kontrola	Stymulacja	
Lp. przypadków	4	4	
% całości	22,46	22,59	
VSL [$\mu\text{m/s}$]	3,67	3,51	
HHD [$\mu\text{m/s}$]	0,77	0,75	
LHD [$\mu\text{m/s}$]	0,36	0,35	
CBF [Hz]	2,77	2,64	

Tabela 1c

Subpopulacja III		0,5h M ₁ P ₂	
Typ	Kontrola	Stymulacja	
Lp. przypadków	4	4	
% całości	35,19	49,92	
VSL [$\mu\text{m/s}$]	19,68	23,51	
HHD [$\mu\text{m/s}$]	1,79	1,91	
LHD [$\mu\text{m/s}$]	1,32	1,58	
CBF [Hz]	2,62	2,50	

plemników różniących się sposobem poruszania [6]. Za kryterium określające ich liczbę wybrano prawdopodobieństwo lepszego dopasowania krzywą

teoretyczną (określaną przez minimalną wartość CHI – kwadrat) modelu teoretycznego. Model teoretyczny uwzględnia większą liczbę różnych subpopulacji [6].

3. Wyniki

Na rys. (1–16) przedstawiono rozkłady badanych parametrów kinetyki plemników otrzymane dla pojedynczych przypadków w próbkach poddanych stymulacji i próbkach kontrolnych. W tabelach (1–14) pokazano dla ilustracji wartości średnie tych parametrów w poszczególnych subpopulacjach. Tabele (1–4) dotyczą stymulacji w czasie 0,5 h w trybie M1P2, (5–8) – stymulacja w czasie 0,5 h w trybie pracy M1P3, (9–11) – stymulacja w czasie 1 h w trybie pracy M1P2 oraz (12–14) – stymulacja w czasie 1 h w trybie pracy M1P3.

W przypadkach stymulowanych programem M₁P₂ w czasie 0,5 h wyodrębniono trzy subpopulacje dla każdej próbki. Dodatkowo pojawiła się czwarta w dwóch przypadkach (Tabele 1a–1d).

Dla subpopulacji I i II nie zauważono istotnych zmian w parametrach ruchu w porównaniu z grupą kontrolną.

Natomiast w III grupie w odniesieniu do grupy kontrolnej, nastąpiło zwiększenie prędkości liniowej oraz wzrósł procent plemników o takich parametrach. Parametry HHD i LHD również uległy zmianom. W

Tabela 1b

Subpopulacja II		0,5h M ₁ P ₂	
Typ	Kontrola	Stymulacja	
Lp. przypadków	4	4	
% całości	21,28	18,42	
VSL [$\mu\text{m/s}$]	5,98	5,69	
HHD [$\mu\text{m/s}$]	1,05	0,99	
LHD [$\mu\text{m/s}$]	0,49	0,46	
CBF [Hz]	2,76	2,74	

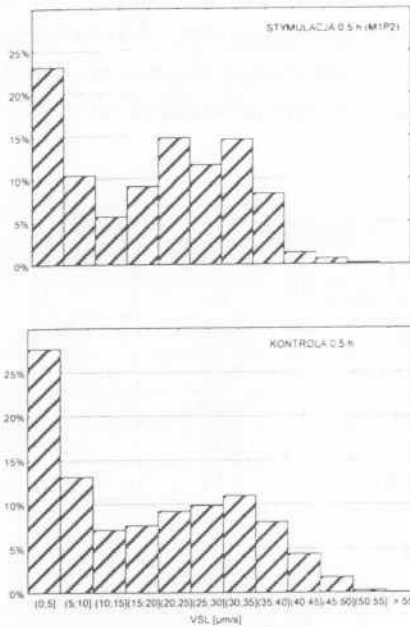
Tabela 1d

Subpopulacja IV		0,5h M ₁ P ₂	
Typ	Kontrola	Stymulacja	
Lp. przypadków	2	2	
% całości	42,15	18,14	
VSL [$\mu\text{m/s}$]	29,25	33,98	
HHD [$\mu\text{m/s}$]	1,79	1,56	
LHD [$\mu\text{m/s}$]	1,53	1,64	
CBF [Hz]	2,55	2,73	

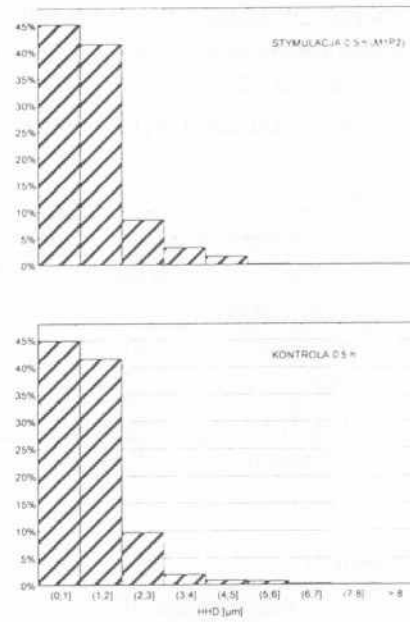
subpopulacji IV VSL zwiększyło się, jednak ilość tak szybkich plemników uległa zmniejszeniu. Prawdopodobnie część plemników przeszła do innych subpopu-

lacji. W pozostałych parametrach kinetyki wystąpiły zmiany w LHD i CBF. Zmniejszenie wartości niektórych parametrów przełożyło się na wzrost prędkości liniowej. Widoczne jest też zjawisko „przechodzenia” pomiędzy subpopulacjami, co przejawia się zmianą

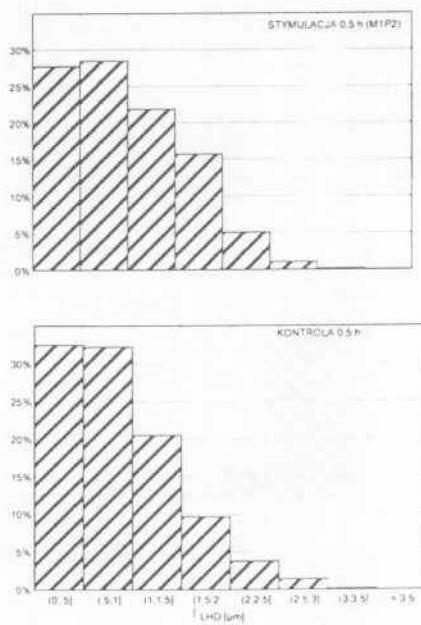
odsetka plemników w II – IV subpopulacji w porównaniu z grupą kontrolną. Zmiany parametrów ruchu po stymulacji M_1P_2 w próbce kontrolnej przedstawiają rysunki (1 – 4).



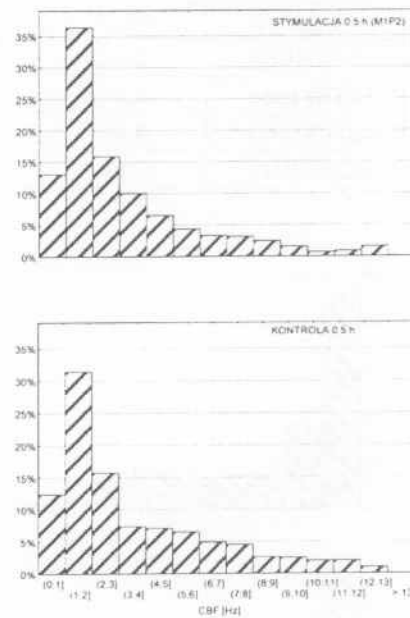
Rys. 1



Rys. 2



Rys. 3



Rys. 4

Rys. (1 – 4) Zmiany rozkładu parametrów ruchu po stymulacji programem M_1P_2 w czasie 0,5h w stosunku do odpowiednich parametrów grupy kontrolnej.

W przypadku próbek poddanych symulacji M_1P_3 stosowanej przez 0,5h wyodrębniono w sumie cztery subpopulacje, przy czym subpopulacja I wyodrębniona została w czterech przypadkach i IIb tylko dla jednego. W grupach I – III nie zauważono istotnych zmian parametrów ruchu z wyjątkiem CBF w grupie II (tabela 2a – 2c).

Z powyższych tabel wynika, że w subpopulacji IIb

doszło do niewielkiej zmiany VSL, HHD i CBF. Szybszych plemników było nieznacznie więcej niż w grupie kontrolnej (Tabela 2d). Z rysunku 5 wynika, że po stymulacji programem M_1P_3 w czasie 0,5 h zmniejszeniu uległa liczba „wolnych” plemników, czyli o najmniejszych wartościach VSL. Z kolei analiza rysunków 6, 7 i 8 wskazuje na zmniejszenie HHD, LHD i CBF w najmniejszych przedziałach ich wartości.

Tabela 2a

Subpopulacja I 0,5h M_1P_3		
Typ	Kontrola	Stymulacja
Lp. przypadków	4	4
% całości	30,05	28,81
VSL [μm]	3,44	3,58
HHD [μm]	0,72	0,73
LHD [μm]	0,34	0,36
CBF [Hz]	2,68	2,52

Tabela 2c

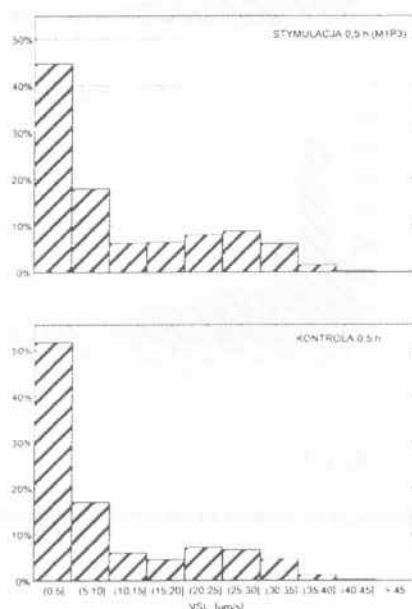
Subpopulacja III 0,5h M_1P_3		
Typ	Kontrola	Stymulacja
Lp. przypadków	6	6
% całości	46,26	47,28
VSL [μm]	22,42	22,39
HHD [μm]	1,65	1,63
LHD [μm]	1,35	1,32
CBF [Hz]	2,68	2,59

Tabela 2b

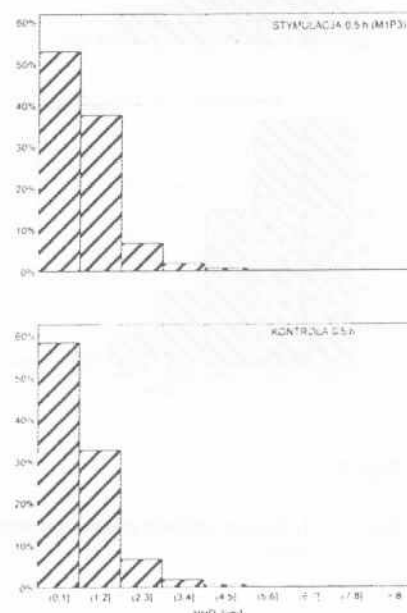
Subpopulacja II 0,5h M_1P_3		
Typ	Kontrola	Stymulacja
Lp. przypadków	6	6
% całości	30,90	30,26
VSL [μm]	5,25	5,54
HHD [μm]	0,97	1,0
LHD [μm]	0,46	0,47
CBF [Hz]	2,54	2,61

Tabela 2d

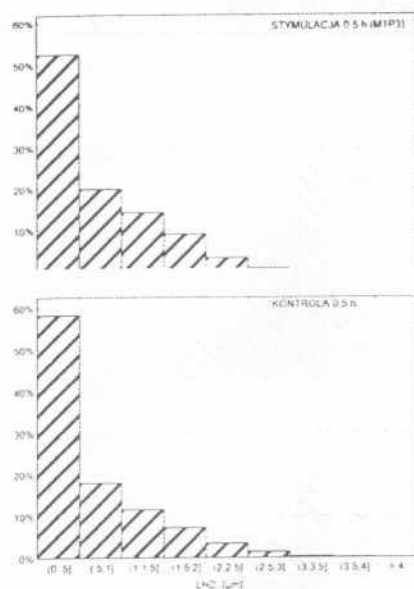
Subpopulacja IIb 0,5h M_1P_3		
Typ	Kontrola	Stymulacja
Lp. przypadków	1	1
% całości	16,83	19,50
VSL [μm]	6,78	8,06
HHD [μm]	1,11	1,29
LHD [μm]	0,51	0,60
CBF [Hz]	2,66	2,78



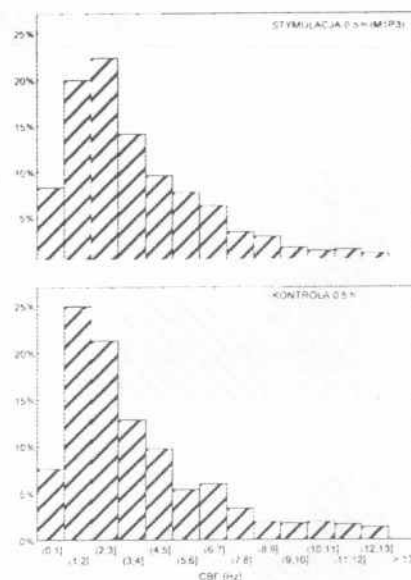
Rys. 5



Rys. 6



Rys. 7



Rys. 8

Rysunki (5 – 8) Zmiany rozkładu parametrów ruchu po stymulacji programem M_1P_2 w czasie 0,5h w stosunku do odpowiednich parametrów grupy kontrolnej.

Tabele 3a, 3a i 3c przedstawiają zmiany wartości liczbowych parametrów ruchu plemników w wyniku stymulacji programem M_1P_2 w czasie 1 h.

Tabela 3a

Subpopulacja I		1h M_1P_2	
Typ	Kontrola	Stymulacja	
Lp. przypadków	1	1	
% całości	21,54	26,56	
VSL [μm]	3,67	3,87	
HHD [μm]	0,69	0,80	
LHD [μm]	0,34	0,38	
CBF [Hz]	4,37	4,52	

Tabela 3b

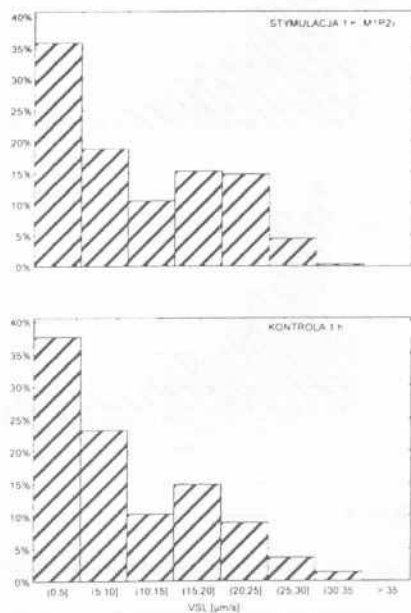
Subpopulacja II		1h M_1P_2	
Typ	Kontrola	Stymulacja	
Lp. przypadków	3	3	
% całości	40,07	34,19	
VSL [μm]	5,046	5,57	
HHD [μm]	0,97	1,04	
LHD [μm]	0,46	0,49	
CBF [Hz]	3,42	3,54	

Tabela 3c

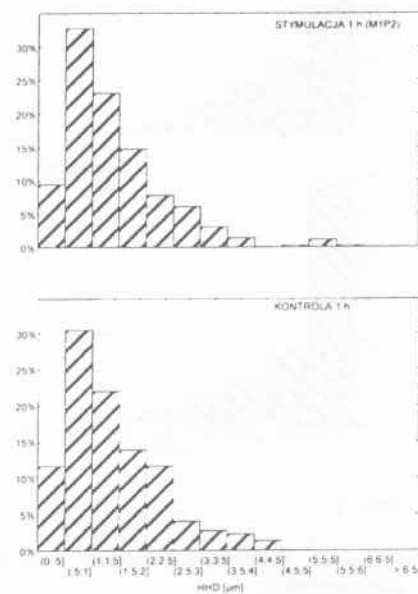
Subpopulacja III		1h M_1P_2	
Typ	Kontrola	Stymulacja	
Lp. przypadków	3	3	
% całości	52,75	56,96	
VSL [μm]	18,48	20,96	
HHD [μm]	1,73	1,78	
LHD [μm]	1,36	1,40	
CBF [Hz]	3,11	3,08	

uległy zwiększeniu w I i II grupie, natomiast LHD w III subpopulacji. Widoczne były także zmiany ilości plemników w porównaniu z grupą kontrolną. Zmiany poszczególnych parametrów kinetyki ruchu zostały zilustrowane na rysunkach 9, 10, 11 i 12.

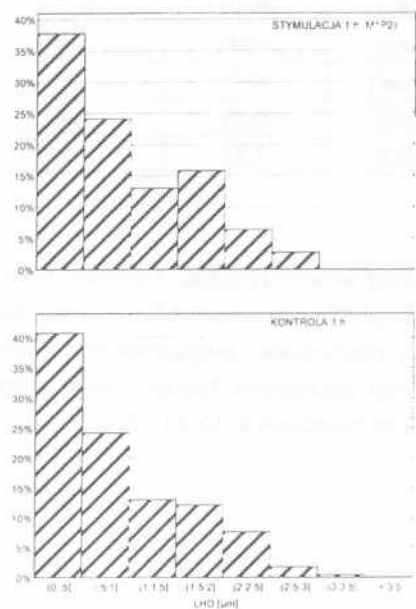
W analizowanych wyżej przypadkach wyselekcjonowano trzy subpopulacje. W grupie III nastąpił niewielki spadek procentowy plemników o najmniejszych wartościach VSL. Zwiększyła się liczba plemników o większych wartościach VSL. Parametry HHD i CBF



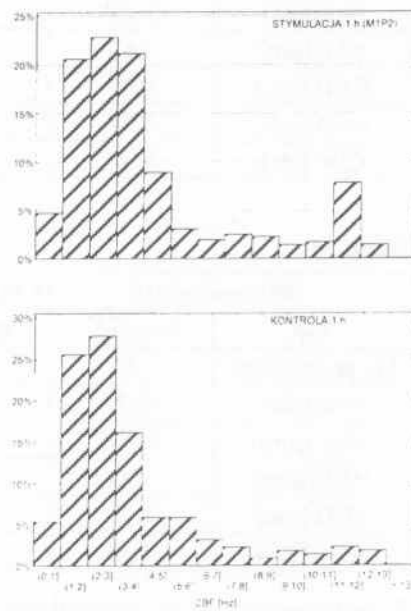
Rys. 9



Rys. 10



Rys. 11



Rys. 12

Rys. (9 – 12). Zmiany rozkładu parametrów ruchu po stymulacji programem M₁P₂ w czasie 1h w stosunku do odpowiednich parametrów grupy kontrolnej.

Kolejny cykl badawczy dotyczył stymulacji programem M_1P_3 przez 1h. W tym cyklu wyodrębniono trzy subpopulacje plemników (p. tabele 4a, 4b i 4c).

Tabela 4a

Subpopulacja I		1h M_1P_3	
Typ	Kontrola	Stymulacja	
Lp. przypadków	4	4	
% całości	26.58	47.27	
VSL [μm]	3.75	4.25	
HHD [μm]	0.76	0.93	
LHD [μm]	0.35	0.39	
CBF [Hz]	3.24	2.75	

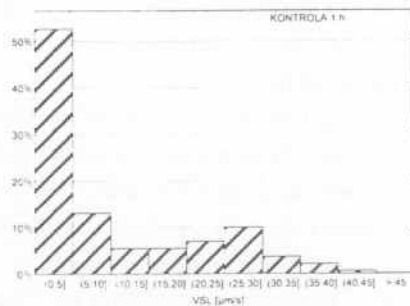
W tym przypadku również zaobserwowano zjawisko „przechodzenia” plemników pomiędzy poszczególnymi subpopulacjami. W grupie II nastąpił wzrost prędkości liniowej VSL przy jednoczesnym dość znacznym spadku liczebności plemników w porównaniu z grupą kontrolną. Nastąpiła również istotna zmiana HHD i LHD. Natomiast w obrębie subpopulacji I VSL nieznacznie wzrosła, jednakże procent plemników z taką prędkością wzrósł prawie dwukrotnie. W tej grupie także wartość parametru HHD wzrosła.

Tabela 4c

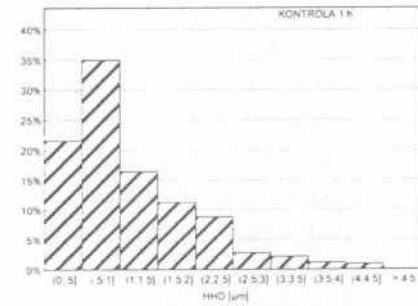
Subpopulacja III		1h M_1P_3	
Typ	Kontrola	Stymulacja	
Lp. przypadków	4	4	
% całości	42.91	38.62	
VSL [μm]	24.96	22.73	
HHD [μm]	1.80	1.72	
LHD [μm]	1.60	1.52	
CBF [Hz]	2.78	2.68	

Tabela 4b

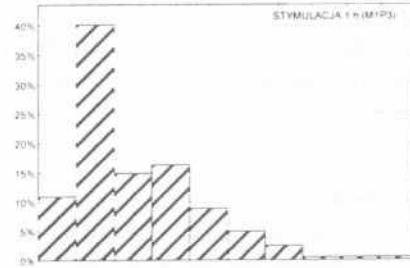
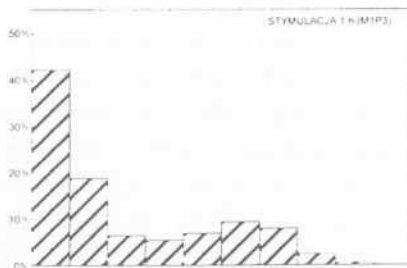
Subpopulacja II		1h M_1P_3	
Typ	Kontrola	Stymulacja	
Lp. przypadków	4	4	
% całości	30.51	14.11	
VSL [μm]	4.85	9.26	
HHD [μm]	0.85	1.51	
LHD [μm]	0.41	0.75	
CBF [Hz]	3.38	2.50	



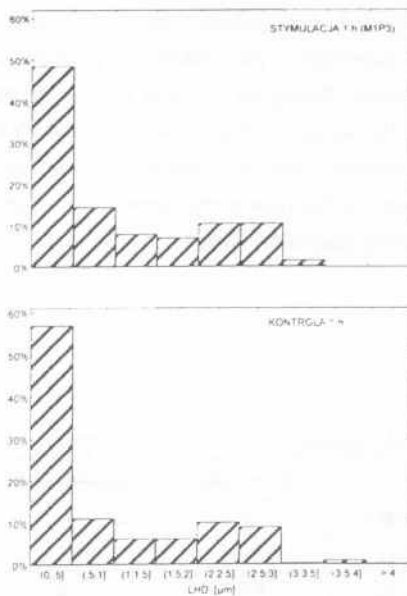
Rys. 13



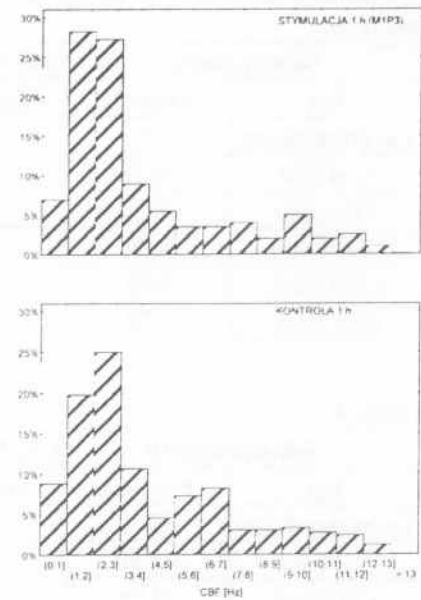
Rys. 14



Fluktuacje wartości liczbowych poszczególnych parametrów kinetyki plemników zilustrowano na rys. 13 – 16.



Rys. 15



Rys. 16

Rys. (13–16). Zmiany rozkładu parametrów ruchu po stymulacji programem M_1P_2 w czasie 1h w stosunku do odpowiednich parametrów grupy kontrolnej.

Na podstawie otrzymanych wyników badań można stwierdzić, że po stymulacji w czasie 0,5 h lub 1 h programami M_1P_2 lub M_1P_3 wystąpiły zmiany w wartościach parametrów ruchu plemników. Pod wpływem pierwszego programu stymulacji w czasie 0,5 h (M_1P_2) zaobserwowano zmiany VSL we wszystkich badanych przypadkach, natomiast pod wpływem drugiego (M_1P_3) tylko w jednej próbie. W programach stymulacji trwających 1h, zmiany VSL nastąpiły we wszystkich badanych próbkach. Po godzinnej stymulacji wyodrębniono 3 subpopulacje plemników dla każdego programu stymulacji.

Przy stymulacji programami M_1P_2 lub M_1P_3 zaobserwowano procentowy wzrost liczby plemników o większych wartościach VSL. Zwiększyła się także liczba plemników o dużych wartościach parametru CBF.

4. Wnioski

Z uzyskanych wyników badań wpływu zmiennego pola magnetycznego generowanego przez magneto-stymulator VIOFOR JPS w zakresie ELF fal elektromagnetycznych wynikają następujące wnioski:

- po zastosowaniu stymulacji M_1P_2 lub M_1P_3 wystąpiły widoczne zmiany wartości liczbowych wszystkich parametrów kinetyki plemników, a w

szczególności VSL i CBF,

- dłuższy czas stymulacji (1h) w niewielkim stopniu wpływa na wzrost powyższych parametrów kinetyki badanych plemników,
- wyniki badań sugerują, że powstałe po stymulacji różnice w wartościach parametrów kinetyki plemników należy odnieść do powstawania w nich dodatkowych „rezerw energetycznych” związanych z działaniem zmiennego pola magnetycznego,
- zmienne pole magnetyczne generowane przez VIOFOR JPS w oddziaływaniu z żywą materią powoduje wystąpienie mechanizmów: elektrodynamicznego, jonowego rezonansu cyklotronowego oraz magnetomechanicznego. Mechanizmy te są odpowiedzialne za wzrost aktywności pierwotnej pompy protonowej w łańcuchu oddechowym mitochondrium plemników. Sprężenie pompy pierwotnej z pompą protonową wtórną powoduje w konsekwencji wzrost gradientu stężenia protonów w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej plemników. Następuje wówczas wzrost syntazy ATP,
- powyższy proces zwiększając „rezerwy energetyczne” komórek plemników ujawnia się pośrednio poprzez wzrost liczby plemników o większych wartościach VSL oraz CBF.

- uzyskane wyniki badań oprócz celów poznawczych mogą również znaleźć zastosowanie w praktyce klinicznej.

Literatura

1. M. Sameczuk, M. Kupisz (red.): *Andrologia*. PZWL, Warszawa 1998
2. M. Warchoń, F. Jaroszyk, J.B. Warchoń: *Analiza ruchu plemników przy zastosowaniu komputerowej analizy obrazu*. *Gin. Pol.*, 69(6) (1998) 532–537
3. W. Kordan, J. Strzeżek: *Biochemiczne mechanizmy regulacji ruchu plemników ssaków*. Postępy Biologii Komórki, 4 (1997) 543–560.
4. W. Warchoń, M. Kotwicka: *Temperature dependent hysteresis – like changes of motility parameters in human spermatozoa*. *Folia Histochem. et Cytobiol.*, 40(2) (2002) 167–168.
5. W. Warchoń, J.B. Warchoń, K. Filipiak, Z. Karaś, F. Jaroszyk.: *Analysis of spermatozoa movement using a video imaging technique*. *Histochem. Cell Biol.*, 106(5) (1996) 521–526.
6. W. Warchoń: *Badanie ruchu plemników metodą komputerowej analizy obrazu*. Rozprawa doktorska AM, Poznań 1998.

Spis treści/Contents

Inżynieria biomedyczna/Biomedical Engineering

Katarzyna Wojaczyńska-Stanek, Elżbieta Marszał, Agnieszka Krzemień-Gabriel, Jolanta Mniszek, Malgorzata Sitek-Gola

Monitorowanie termowizyjne terapii przewlekłego zapalenia zatok przynosowych u dzieci leczonych antybiotykami oraz przy użyciu lasera biostymulacyjnego (Thermographic monitoring of treatment of chronic sinusitis in children treated by antibiotics or lasertherapy) 75

Janusz Kowalski

Filtracja odwrotna a czytelność obrazów radioizotopowych (Inverse filtering versus radioisotope images distinctness) 83

Anna Konieczna, Aneta Demidaś, Ewa Boerner

Ocena gęstości mineralnej kości studentów w wieku 20-29 lat (The estimation of the bone mineral density in students in age of 20-29 years) 87

Medycyna fizykalna, pola magnetyczne/Physical medicine, magnetic fields

Feliks Jaroszyk, Honorata Nawrocka, Wojciech Warchol, Dariusz Włodarczyk

Kinetyka transportu subpopulacji plemników w stanie in vitro w warunkach wpływu zmiennego pola magnetycznego z zakresu ELF (Sperm motility in vitro under the influence of variable magnetic field in the range of ELF) 91

Grzegorz Cieślar, Irena Rozmus-Kuczia, Urszula Łatka, Beata Matyszkiewicz, Teresa Krzeszkowiak, Aleksander Sieroń

Ocena przydatności klinicznej zestawu Viofor JPS System Magnetic & Light Therapy do magnetostymulacji skojarzonej z energią światła w leczeniu zmian zwyrodnieniowych i zapalnych stawów kończyn (Estimation of clinical efficacy of Viofor JPS System Magnetic & Light Therapy – device for magnetostimulation connected with light energy in the treatment of degenerative and inflammatory diseases of joints) 101

Agnieszka Pisula, Elżbieta Jackowska, Agnieszka Trojańska, Jan Łazowski

Wpływ magnetostymulacji na elektryczną pobudliwość mięśni (Influence of magnetic stimulation on the muscle electric excitability) 119

Bogna Dobrzyńska, Wiesław Prusek, Bożena Zaremba-Nizioł, Grzegorz Cieślar, Aleksander Sieroń

Badanie skuteczności terapeutycznej i tolerancji zastosowania magnetostymulacji systemem Viofor JPS w leczeniu dzieci chorych na młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów (Estimation of therapeutic efficacy and tolerance of magnetostimulation with use of Viofor JPS system in the treatment of children with juvenile idiopathic arthritis) 123

Medycyna fizykalna, laseroterapia/Physical medicine, lasertherapy

Aneta Demidaś, Anna Koziatek, Ewa Boerner, Anna Konieczna

Biostymulacyjne promieniowanie laserowe w regeneracji czucia dotyku (Low level laser therapy in regeneration sense of touche) 131

Lasery w medycynie/Lasers in Medicine

Ewa Kostuś, Marta Misiuk-Hojło, Maria Turska

Lasery neodymowe w chirurgii okulistycznej – przegląd (Nd:YAG lasers in ophthalmic surgery – survey). 137

Listy do Redakcji/Letters to Editors

Biuletyn Informacyjny PTIB Nr 2/2004 145

Biuletyn Informacyjny PTIB Nr 3/2004 151

Biuletyn Informacyjny PTIB Nr 4/2004 165



KWARTALNIK POD PATRONATEM PTIB

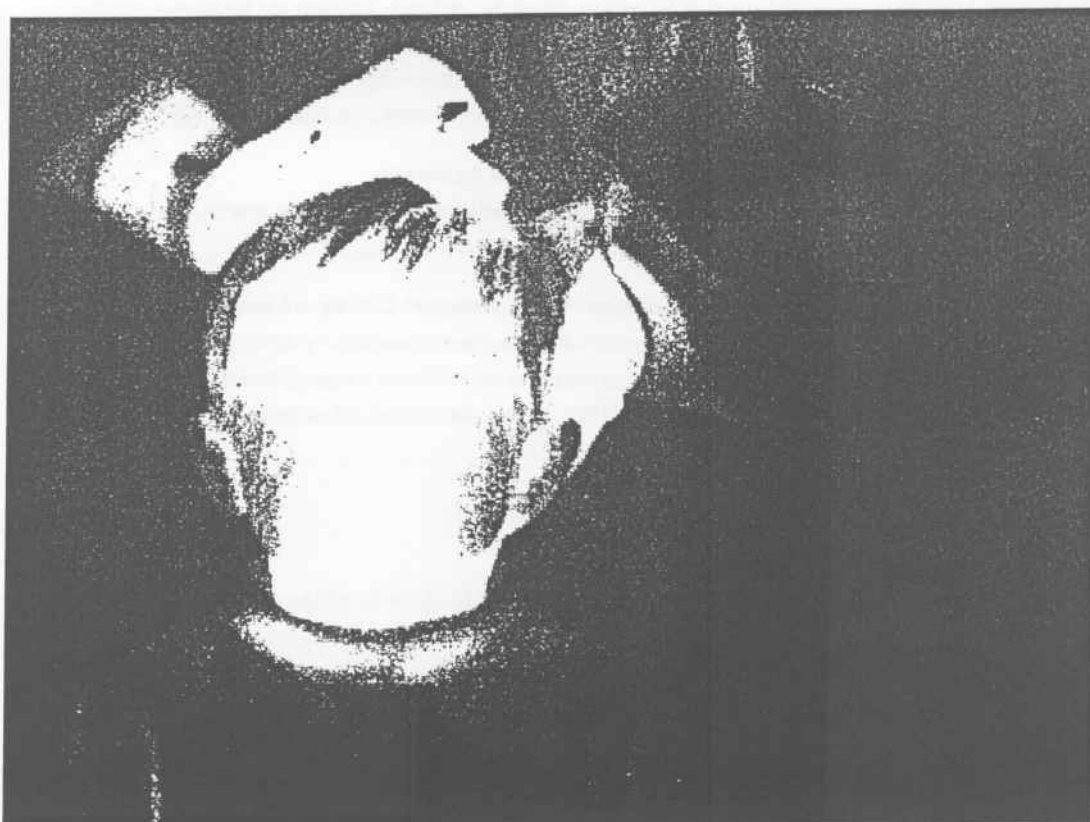
ISSN 1234-5563

Najnowsze osiągnięcia optoelektroniki i informatyki w medycynie i inżynierii biomedycznej

cena 20 zł

MEDYCYNA FIZYKALNA LASERY KOMPUTERY

INŻYNIERIA BIOMEDYCZNA



Diagnostyka termowizyjna przewlekłego zapalenia zatok nosowych (str. 75)

ACTA BIO – OPTICA *NR 3-4/2004 vol. 10*
ET INFORMATICA MEDICA