

2011

Efecte biofizice ale câmpurilor electromagnetice asupra celulelor haploide

Rezumat la teza de Doctorat

UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE FIZICĂ
DEPARTAMENTUL DE FIZICĂ BIOMEDICALĂ

Conducător de doctorat:
C.S.I. Dr. Vasile V. Morariu
Doctorand:
Zamfir Truța



CUPRINS

<u>SCURT REZUMAT AL LUCRĂRII</u>	4
<u>1. NOTIUNI TEORETICE ȘI INTRODUCTIVE</u>	7
1.2. CELULE UMANE HAPLOIDE	7
1.3. ENERGETICA SPERMATOZOIDULUI UMAN	8
1.4. CONSUMUL DE ADENOSIN TRIFOSFAT (ATP). PRODUCEREA ENERGIEI MECANICE	9
1.5. PARAMETRII STANDARD DE STUDIU AI MIȘCĂRII CELULELOR HAPLOIDE	10
1.6. CÂMPUL GEOMAGNETIC TERESTRU (GMF)	12
1.7. BAZE TEORETICE ALE STUDIULUI CELULELOR UMANE HAPLOIDE MASCULINE ÎN CÂMP MAGNETIC ZERO (ZMF)	13
<u>2. METODE EXPERIMENTALE</u>	14
2.1. OBȚINEREA PROBELOR ȘI PROTOCOLUL DE MANIPULARE	14
2.2. METODA DE OXIDAZĂ A GLUCOZEI (GO)	15
2.3. METODA SPECTROSCOPICĂ ULTRAVIOLET-VIZIBIL (UV-VIS)	15
2.4. METODA DE ANALIZĂ A SPERMEI ASISTATĂ PE COMPUTER (C.A.S.A.), DETERMINAREA PARAMETRIILOR MOTILITĂȚII ȘI VELOCITĂȚII	15
2.5. COMPENSAREA GMF ȘI EXPUNEREA PROBELOR	16
2.6. METODE STATISTICE ȘI ANALIZA STATISTICĂ A REZULTATELOR	17
<u>3. INFLUENȚELE CÂMPURILOR MAGNETICE ASUPRA CELULELOR</u>	18
3.1. MECANISME DE INTERACȚIUNE	18
3.2. INFLUENȚELE RADIAȚIILOR ELECTROMAGNETICE (EMF) GENERALE ASUPRA CELULELOR HAPLOIDE	20

3.3.	INFLUENȚELE CÂMPULUI MAGNETIC STATIC (SF) ASUPRA CELULELOR HAPLOIDE	20
3.4.	INFLUENȚELE GMF ASUPRA CELULELOR HAPLOIDE	21
3.5.	BAZA SPECTRALĂ A LICHIDULUI SEMINAL UMAN	22
3.6.	DETERMINAREA CONCENTRAȚIEI ÎNȚIALE A GLUCOZEI ÎN PROBELE ANALIZATE METODA PROPRIE DEZVOLTATĂ PE BAZA PICULUI UV-VIS AL GLUCOZEI (GUP)	23
3.7.	VARIAȚIA ÎN TIMP A PROCENTAJELOR RAPID ȘI LENT PROGRESIVE ÎN GMF	27
<u>4.</u>	<u>INFLUENȚELE ZMF ASUPRA CELULELOR HAPLOIDE</u>	<u>28</u>
4.1.	INFLUENȚA TEMPERATURII ASUPRA VELOCITĂȚII ÎN LINIE DREAPTĂ (VAP) ȘI ASUPRA VIABILITĂȚII CELULELOR HAPLOIDE MASCULINE ÎN ZMF	28
4.2.	INFLUENȚA ZMF ASUPRA VAP A CELULELOR HAPLOIDE MASCULINE UMANE	29
4.3.	INFLUENȚA ZMF ASUPRA LINIARITĂȚII TRAIECTORIEI (LIN) CELULELOR HAPLOIDE MASCULINE UMANE	31
4.4.	INFLUENȚA ZMF ASUPRA AMPLITUDINII DE DEPLASARE LATERALĂ A CAPULUI (ALH) A CELULELOR HAPLOIDE MASCULINE UMANE	32
4.5.	INFLUENȚA ZMF ASUPRA FRECVENȚEI DE BĂȚAIE A COZII (BCF) A CELULELOR HAPLOIDE MASCULINE UMANE	33
4.6.	CONSUMUL DE GLUCOZĂ AL CELULELOR EXPUSE ÎN ZMF ȘI GMF	34
4.7.	CORELAREA PARAMETRIILOR DE STUDIU	37
4.8.	DISCUȚII DE SINTEZĂ	39
4.9.	CONSIDERENTE DE ACTIVITATE GEOMAGNETICĂ	41
<u>5.</u>	<u>CONCLUZII</u>	<u>42</u>
<u>6.</u>	<u>REFERINTE</u>	<u>43</u>

SCURT REZUMAT AL LUCRĂRII

Studiul prezentat își propune să investigheze modul în care se modifică parametrii de motilitate ai fertilității masculine umane la schimbarea factorului ambient natural, câmpul geomagnetic terestru (GMF). Fertilitatea masculină umană a scăzut considerabil în ultimul secol, și există puține studii care să investigheze motivele scăderii estimărilor de fertilitate la bărbați. Pe de altă parte valoarea GMF scade și ne îndreptăm spre o perioadă de schimbare a polilor magnetici. Trecerea se va face într-o perioadă de timp în care Pământul va avea inevitabil un câmp magnetic aproape nul, câmp magnetic zero (ZMF). Prezenta teză de doctorat își propune să studieze schimbările ce apar la parametrii de fertilitate microscopici ai celulei masculine de reproducere, spermatozoidul, atunci când GMF este compensat și se obțin condiții de ZMF.

Întrucât acești factori sunt primordialii în procesul natural de reproducere, ne-am propus să-i studiem din punct de vedere bioenergetic. Pentru aceasta am studiat legătura dintre substratul bioenergetic primar (glucoză) folosit de către celulele haploide umane și procesul pentru care se folosește energia rezultată prin scindarea glucozei, respectiv producerea mișcării mecanice a spermatozoizilor. Am considerat ca parametru de pornire consumul de glucoză, și ca parametri finali, parametrii de motilitate ai fertilității masculine umane. Menționăm că rezultatele sunt prezentate ilustrativ, cu prezentarea în detaliu a câtorva probe pentru fiecare parametru studiat.

Lucrarea este structurată în 5 capitole. În prima parte am prezentat o scurtă trecere în revistă a cercetărilor în domeniu existente în prezent. În partea a doua am prezentat în detaliu metodele folosite în tratarea acestui subiect, cu accent pe metodele proprii. În partea a treia am prezentat influențele câmpurilor magnetice asupra celulelor umane, cu accentul pe rezultatele proprii și posibile explicații ale fenomenelor investigate. În partea a patra am prezentat în detaliu rezultatele proprii ale influențelor ZMF asupra parametrilor de motilitate ai fertilității masculine umane. Am discutat în detaliu posibile justificări a rezultatelor, am corelat rezultatele și le-am prezentat în sinteză. Deasemenea am prezentat în detaliu normele și metodologia ce trebuie respectată, pentru a relua și reproduce experimentele prezentate, cu evitarea erorilor nedorite, de către oricine interesat de acest subiect. În partea a cincea am prezentat concluziile clare rezultate din experimentele noastre.

Pentru a nu distruge chimic probele în timpul determinărilor de concentrație a glucozei, ne-am propus dezvoltarea unei metode neinvazive și nedistructive a probei. În acest

sens, am efectuat măsurători preliminare pentru determinarea unei metode, care să dea rezultate cu erori la nivelul celor mai noi metode chimice acceptate în prezent. Măsurătorile preliminare au arătat că spectroscopia Raman nu dă un coeficient de determinare acceptabil, la măsurarea concentrației glucozei în lichidul seminal uman. Am ales spectroscopia UV-VIS ca fiind mai potrivită, cu un coeficient de determinare acceptabil scopului propus. Din informațiile pe care le deținem la această oră, studiul nostru este efectuat în premieră mondială. Metoda proprie de studiu a fost dezvoltată și validată conform cerințelor în domeniu și ea aduce o flexibilitate în plus domeniului de cercetare specific.

Măsurătorile au arătat că spermatozoizii umani consumă mai multă glucoză în ZMF în comparație cu GMF. Deasemenea rezultatele noastre arată că parametrii de motilitate ai spermatozoizilor umani, folosiți în prezent pentru caracterizarea fertilității masculine umane, își schimbă valorile la expunerea în ZMF în comparație cu expunerea în GMF ca și control.

Corelările statistice dintre parametrii de studiu considerați au fost făcute și rezultatele prezentate în detaliu. Din studiul de sinteză a acestor corelări, rezultă clar că ZMF stimulează motilitatea spermatozoizilor umani în comparație cu GMF, și crește semnificativ estimările de fertilitate masculină.

Aș dori să mulțumesc pe această cale în special D-lui C.S.I. profesor asociat Dr. Morariu V.Vasile, conducătorul de doctorat, pentru îndrumarea atentă, pentru timpul acordat studiului critic constructiv, și colaborarea fructuoasă pe care am avut-o cu dânsul în acești ani. Le mulțumesc pe această cale și profesorilor care m-au sprijinit și îndrumat în timpul desfășurării studiului: Prof. Dr. David Leontin, Prof. Dr. Cozar Onuc, Senior Principal Scientist P.h.D. Michael J. Harrison, C.S.I. Dr. Turcu Ioan, Prof. Dr. Isvoran Adriana, Prof. Dr. Aștilean Simion, Prof. Dr. Pop Viorel, C.S.I. Dr. Bratu Ioan.

Deasemenea le mulțumesc și celor care au facilitat activitățile de cercetare, sau au cercetat efectiv în cadrul acestui studiu : C.S.III. Dr. Neamțu Silvia, C.S. Dr. Buimaga Luiza, C.S.I. Dr. Cojocariu Cristina, Prof. Dr. Stamatian Florin, Prof. Dr. Surcel Ioan (†), Medic Dr. Micu Romeo, Biolog Dr. Lerințiu Stela, Biolog Dr. Surd Stela, Biolog Gârlovanu Marinela, C.S. Dr. Fărcau Cosmin, Tehnician IAS Puia Mircea, Medic Dr. Colhon Dan, Tehnician Săcăliș Ana, familiei mele, și în mod deosebit soției mele Mihaela și copiilor mei Antonia și David.

CONTRIBUȚIA ORIGINALĂ

Datele prezentate în această lucrare sunt originale și au fost publicate după cum urmează:

Articole publicate în reviste indexate ISI:

Truța Z., Gârlovanu M., Lerințiu S., Micu R., A new method for human semen glucose concentration evaluation, *Romanian Biotechnological Letters*, Vol.15 (6) 5764-5772 (2010) <http://www.rombio.eu/rbl6voll5/cuprins.html>

Truța Z., Truța M., Micu R., Zero magnetic field influence on human spermatozoa glucose consumption, accepted for publication by *Romanian Biotechnological Letters*, articol nr.313, in Vol.16 (5) (2011).

Articole publicate în reviste indexate BDI:

Truța Z., Neamțu S., Morariu V. V., Zero magnetic field influence on in vitro human spermatozoa cells behavior. *Rom.J.Biophysics* 15:73-77 (2005)

Truța Z., Lerințiu S., Gârlovanu M., Morariu V. V., Zero magnetic field influence on male reproductive cells progressive motility distribution, *Sudia Universitatis Babeș-Bolyai, Physica* LI 1:39-43 (2006)

Neamțu S., Truța Z., Boldizsar E., Pop C.V.L., V.V. Morariu, Cell motility in zero magnetic field, *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Physica*, (2005) L(4b): 697-700

Conferinte:

Truța Z., Neamțu S., Morariu V. V., The influence of zero magnetic field on in vitro human spermatozoa cells behavior, Advanced biomaterials and biophysical techniques, may 26-28,2005, 8thNational Biophysics Conference (2005)

Truța Z., Neamțu S., Morariu V. V., Spermatozoa aging is slowed down in ZMF, Isotopic and molecular processes, Fourth PIM Conference, Cluj-Napoca, sept.22-24, (2005)

Truța Z., Lerințiu S., Gârlovanu M., Morariu V. V., Human haploid male germ cells trajectory in zero magnetic fields. Fifth PIM Conference, Cluj-Napoca, sept.20-22, p. 250 (2007)

Truța Z., Lerințiu S., Gârlovanu M., Micu R., Morariu V. V., Is zero magnetic field influencing human spermatozoa dynein molecular motor? 6th EBSA Congress, Imperial College, London, UK, *European Biophysics Journal* 36 (1) S197 (2007)

CELULE UMANE HAPLOIDE

Van Beneden a descoperit în 1883 că gameții au un număr redus de cromozomi. Cromozomii sunt grupări structurale care i-au naștere din nucleul celulelor în timpul diviziunii [WHO, 2001].

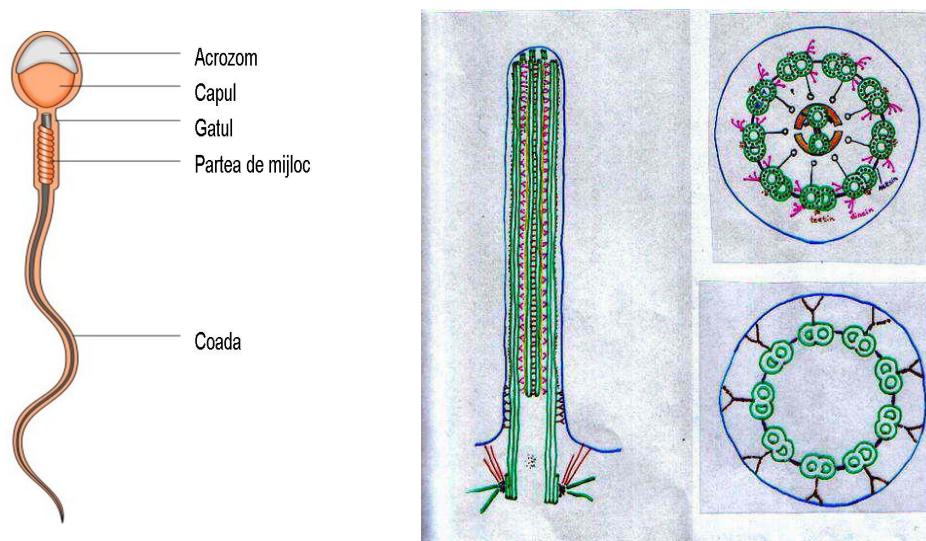


Fig. 1 Structura de bază a spermatozoidului uman și secțiune transversală prin coada spermatozoidului uman

Abia în 1956 s-a determinat că numărul de cromozomi finali la oameni este 46, iar procesul prin care numărul de cromozomi este redus la jumătate se numește diviziune meiotică. Celulele care poartă astfel doar jumătate din informația genetică, având doar 23 cromozomi, se numesc celule haploide. Celulele umane de reproducere, gameții, sunt celule haploide (Fig.1).

Spermatozoidul uman este o celulă mobilă haploidă, ce transportă jumătate din informația genetică a organismului masculin uman zigotului. El este generat prin diviziune în tuburile seminiferoase ale testisului.

Spermatozoidul uman este lung de aproximativ 50 μ m și este alcătuit din două regiuni distincte morfologic și funcțional, capul și coada, care sunt închise în aceeași membrană (Fig.1). Funcțiile spermatozoidului sunt de transmitere a setului haploid de cromozomi și de fecundare a ovulului, ceea ce duce la activarea procesului de dezvoltare al ovulului.

Această informație genetică haploidă, este condensată în nucleul localizat în capul spermatozoidului. Coada spermatozoidului este formată din microtubuli, doi singulari în interior, înconjurați de nouă microtubuli dubli în exterior. În partea anterioară microtubulii sunt înconjurați de mitocondrii, care colectează nutrienții din mediu. Acești nutrienți din lichidul seminal, sunt convertiți în adenzin trifosfat (ATP), combustibilul biologic folosit pentru mișcarea cozii.

ENERGETICA SPERMATOZOIDULUI UMAN

Cei mai importanți nutrienți extracelulari pe care spermatozoidul uman îi folosește sunt glucoza și fructoza. Glucoza este substratul energetic folosit pentru lanțul de reacții biochimice ce au loc în glicoliză, iar fructoza pentru fructoliză. Produsul final al fructolizei este, la spermatozoizii umani, acidul lactic.

Această structură permite interconversia ATP-ului și ADP-ului (adenozin difosfat) între păturile fibroase, unde ATP-ul este produs prin glicoliză, și dineina ATP-aza axonemală, unde ATP-ul este consumat [Wenlei C. et.all, 2006]. Numai D-glucoza este activă biologic, în timp ce imaginea sa oglindă, L-glucoza nu poate fi metabolizată în procesul biochimic cunoscut ca glicoliză.

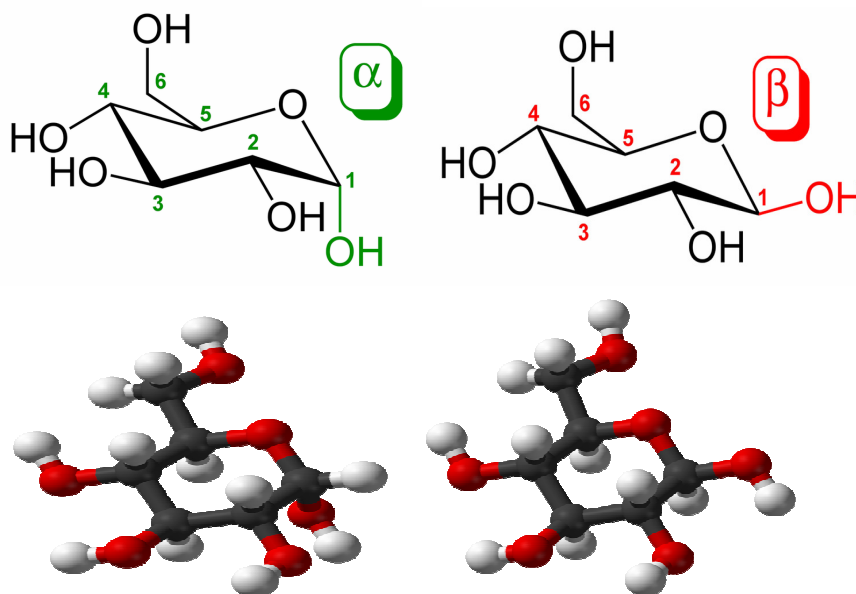


Fig. 2 Forma ciclică și structura 3D pentru α -D glucopiranoză (stânga) și β -D glucopiranoza glucozei (dreapta)

Glucosa se prezintă sub forma unei substanțe albicioase, fie ca și cristal solid, fie în soluție apoasă [Kirschner and Woods, 2001]. Este prezentată mai jos formula moleculară a glucozei sub formă de lanț (Fig.3), și sub formă ciclică de glucopiranoză (Fig.2). Formula chimică a glucozei este ($C_6H_{12}O_6$) și se găsește predominant sub forma ciclică la pH 7, iar în soluție apoasă sub formă de lanț deschis (aciclic) și inel (ciclic) în echilibru. Se observă că deși inelul chimic este o hexoză, el conține numai 5 atomi de carbon, de unde denumirea de piranoză. Masa molară a glucozei este $180.16 \text{ g mol}^{-1}$, densitatea 1.54 g cm^{-3} , iar punctul de topire pentru α -D-glucoza: 146°C și pentru β -D-glucoza: 150°C [Gailliot et al., 2007]. Datele corespund statutului standard (la 25°C , 100 kPa).

Glicoliza produce prin anaerobioză, 2 molecule de ATP. Prin oxidarea glucozei la dioxid de carbon, proces cunoscut ca respirație celulară, o singură moleculă de glucoză prin scindare completă eliberează energia necesară pentru a produce 36 de molecule de ATP [Lodish et al., 2004].

CONSUMUL DE ADENOSIN TRIFOSFAT (ATP). PRODUCEREA ENERGIEI MECANICE

Conform statutului standard (la 25°C , 100 kPa) ATP-ul are formula chimică moleculară $C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$, și masa molară 507.181 g/mol . ATP-ul produs este folosit de spermatozoizii umani pentru a produce mișcare mecanică.

Gajewsky și colaboratorii săi au arătat că la această hidrolizare se eliberează cantități de energie ce depind de tipul de legătură chimică care se scindează. Dacă G° este energia liberă Gibbs, vom avea [Gajewski et al., 1986]:

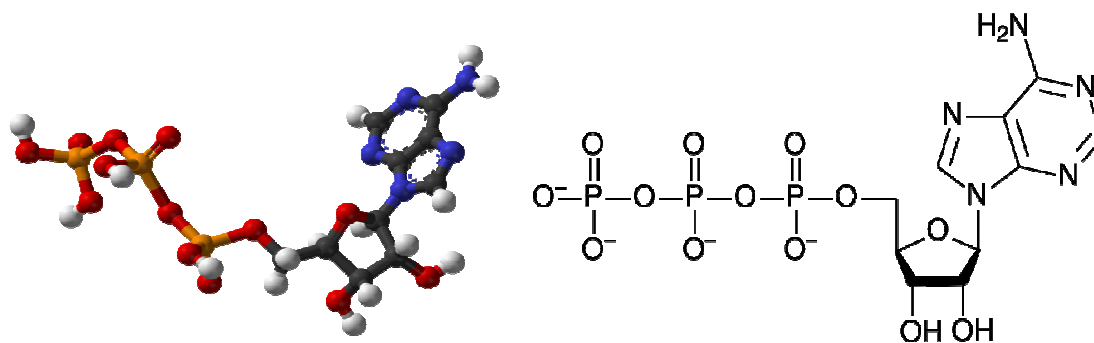


Fig. 3 Formula chimică moleculară a ATP-ului și structura 3D.

Consumul de glucoză în partea principală a cozii este corelat biochimic și cantitativ cu producția de carburant biologic ATP. Se produc aproximativ 200 pmol ATP per 10^6 spermatozoizi în absența glucozei, și aproximativ 1000 pmol ATP per 10^6 spermatozoizi în prezența glucozei [Mukai C et al., 2004]. Se observă ca producția de ATP este de 5 ori mai mare în prezența glucozei. Prin urmare spermatozoizii folosesc glucoza ca sursă bioenergetică primară pentru producerea de ATP.

Odată produs, ATP-ul este consumat cu ajutorul catalizatorului de dineina axonemală ATP-aza [Cao W et al., 2006]. ATP-azele sunt o clasă de enzime care catalizează descompunerea ATP-ului în adenosina difosfat (ADP) și un ion liber de fosfat. Această defosforilare produce energie, care în cazul nostru este folosită în principal pentru culisarea microtubulilor (MT) din coada celulei haploide. Culisarea microtubulilor exteriori față de cei interiori generează o îndoire care ajută la producerea unei mișcări tipice înotului flagelatelor (Fig.1).

ATP-ul și analogii lui stimulează motilitatea spermei [Romac P et al., 2004], iar ATP-ul extracelular, crește potențialul de fertilizare și motilitatea [Rossato M et al., 1999]. Prin culisarea microtubulilor, stimulată de dineina ATP-aza, și executată de brațele de dineină, se obține mișcarea de bătaie a cozii. Acest sistem de culisare a microtubulilor funcționează atât la spermatozoizii mamiferelor, cât și la cei ai echinodermelor [Ishijima S. et.al., 2006]. Dineina ATP-aza, componentul de bază al motoarelor moleculare ale celulelor de germinare, necesită ATP ca și sursă de energie [Du J. et al., 1994].

Perechea centrală de MT se cuplează mecanic cu cele 9 MT exteriori prin proteine ce au devenit conformații stabile prin evoluție. Această cuplare ajută ca flagela spermatozoidului uman de tip 9 + 2 să se îndoie și să decupleze pentru a genera bătaie de putere, alternativ cu cele de revenire [Yang C et al., 2008].

PARAMETRII STANDARD DE STUDIU AI MIȘCĂRII CELULELOR HAPLOIDE

Spermatozoidul odată eliberat se comportă ca și o celulă eucariotă complexă capabilă să producă și să consume energie, asigurându-și astfel un echilibru staționar cu mediul. Pentru a caracteriza motilitatea, viabilitatea și caracteristicile spermatozoizilor au fost definiți un grup de parametri.

Timpul de lichefiere este un parametru strâns legat de vâscozitatea spermei, și lichefierea este cauzată la 10-30 minute după ejaculare de către enzimele proteolitice din prostată (protelaza și amilaza).

Volumul și concentrația spermei, concentrația glucozei, concentrația fructozei și aciditatea sunt parametri macroscopici ce dau o informație bazică despre calitatea probei. O probă normală are pH-ul între 7.2 - 8.0.

Parametrii microscopici uzuali sunt strâns legați de *numărul și forma spermatozoizilor*. O probă normală are o concentrație de cel puțin 20 milioane spermatozoizi/ml, cu un număr total de cel puțin 40 milioane de celule pe proba ejaculată, din care cel puțin 50% să fie motile (să se miște). Numărul total al leucocitelor trebuie să fie mai mic de un milion [Jequier A.M. & Crish J.P., 1986].

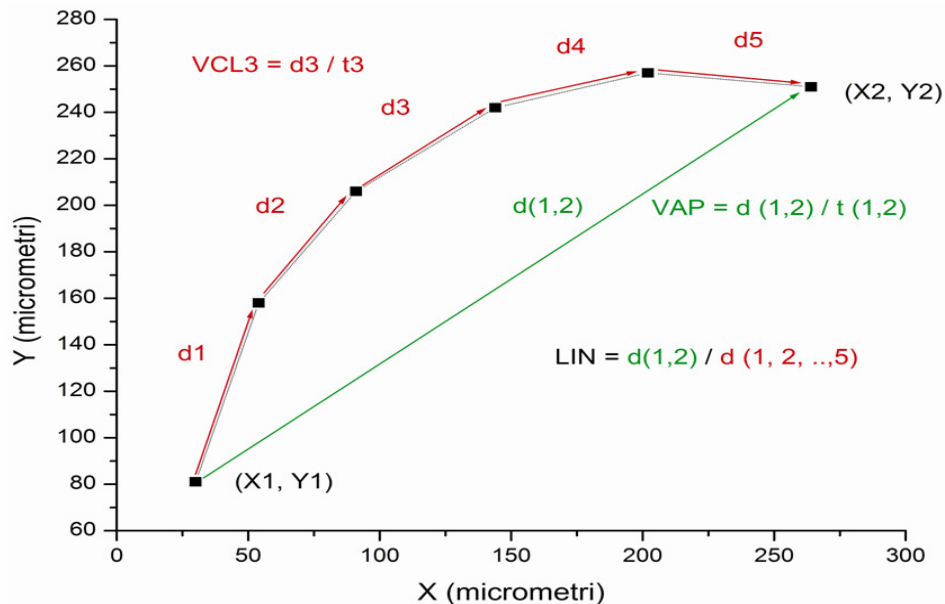


Fig. 4 Împărțirea traiectoriei curbilunii în porțiuni aproximativ drepte, și definirea vitezei curbilinare (VCL), a vitezei în linie dreaptă (VAP), și a liniarității traiectoriei (LIN)

Pentru o probă normală, cu morfologie normală, proporția de celule rapid progresive (cu viteza medie peste 25 $\mu\text{m/s}$) determină calitatea și estimările de fertilitate [Owen Derek H. & Katz F. David †, 2005]. Motilitatea spermatozoizilor poate fi caracterizată printr-un grup de parametrii specifici ce pot fi determinați din înregistrarea și fotografierea secvențială a traiectoriilor celulelor (Fig.4).

VCL, viteza curbilinară se definește ca fiind numeric egală cu distanța strabătută între două puncte, urmărind traiectoria curbilinară, pe unitatea de timp (Fig.7).

VAP, viteza în linie dreaptă se definește ca fiind numeric egală cu distanța străbătută între două puncte, în linie dreaptă, pe unitatea de timp. Ambele viteze se masoară în $\mu\text{m/s}$ pentru a fi mai convenabil, fiind corespunzătoare scării reale specifice mișcării spermatozoizilor umani.

LIN, linearitatea traiectoriei se definește ca fiind raportul dintre distanța străbătută în linie dreaptă și distanța actuală străbătută urmărind traiectoria de mișcare a celulei pentru a se deplasa între cele două puncte considerate (Fig.7). Prin urmare se observă că LIN se poate exprima și în procente, sau deseori printr-un număr cuprins în intervalul [0,1].

ALH, amplitudinea deplasării laterale a capului este o distanță, și se definește ca media distanței de deplasare maximă a capului spermatozoidului, măsurată față de traiectoria curbilinară ce străbate centrul de greutate al celulei, în mișcarea ei între două puncte. Este convenabil să exprimăm această distanță în μm , corespunzător scării reale specifice mișcării spermatozoizilor umani [Ginsburg K.A. et.al., 1988].

CÂMPUL GEOMAGNETIC TERESTRU (GMF)

Un caz particular de câmp staționar care prezintă interes în acest caz este câmpul magnetic terestru. Ne vom referi adesea la *modulul vectorului densitate de flux magnetic* B (inducția magnetică) pentru a caracteriza câmpul magnetic. Câmpul magnetic al Pământului (și câmpul magnetic de suprafață) este cu bună aproximație un dipol magnetic cu un pol aproape de polul nord, și un pol aproape de polul sud.

Temperatura miezului Pământului este peste 1043K, temperatura Curie la care orientările momentelor magnetice de spin devin dezordonate în fier, și, ca urmare contribuția locală a corului Pământului la GMF nu se poate explica prin orientarea momentelor magnetice.

GMF este cauzat de curenții electrici în partea exterioară a păturii lichide a Terrei și nu de aranjarea dipolilor magnetici. Curenții electrici induși în ionosferă generează câmpuri magnetice când atmosfera este mai aproape de Soare, cauzând alterații zilnice care pot defleca GMF cu până la un grad [Herndon J.M., 2003].

Câmpul magnetic terestru își schimbă direcția în medie la fiecare 250.000 ani. Ultimul astfel de eveniment nu a respectat această periodicitate. El a fost determinat pe baza bazaltului din lavă, din cele mai multe părți de pe Terra, și a avut loc acum 780.000 ani.

De la prima măsurătoare de GMF efectuată de Carl Friedrich Gauss în 1835 și până azi GMF a scăzut cu aproximativ 5% [Courtillot V. and Le Mouel J.L., 1988]. Aceste statistici arată că ne îndreptăm spre o perioadă când câmpul magnetic al Pământului își va schimba polaritatea. Pentru o anumită durată de timp, în viitor va exista inevitabil câmp magnetic zero (ZMF).

BAZE TEORETICE ALE STUDIULUI CELULELOR UMANE HAPLOIDE MASCULINE ÎN CÂMP MAGNETIC ZERO

Explicarea influenței ZMF asupra motilității spermatozoizilor umani a fost sugerată în rapoarte [Truța Z et al., 2005; Truța Z et al., 2006, Truța Z et al., 2011]. Pentru a înțelege această influență, trebuie să știm că în câmpul magnetic static este indusă cuplarea reziduală a dipolilor din grupările amino ce se găsesc în structura acizilor nucleici [Ying J et al., 2007]. Pe de altă parte spermatozoizii umani conțin acizi nucleici în ADN-ul transportat condensat în partea de cap. Proteinele de dineină conținute în spermatozoidul uman sunt elemente diamagnetice (respinse ușor în câmp magnetic static) [Alberts B et al., 2002]. Ca rezultat al anizotropiei diamagnetice a proteinelor și a acizilor nucleici din spermatozoidul uman, aceste structuri macromoleculare vor tinde să se orienteze în câmp magnetic.

Există studii care dovedesc că spermatozoizii altor tipuri de mamifere se orientează în câmp magnetic static [Takeuchi T et al., 2002]. Prin urmare, anulând GMF, anulăm câțiva potențiali factori disturbători ai mișcării libere și orientării spermatozoizilor, și, teoretic, ei se vor mișca mai bine. Această prezumție a fost verificată experimental în cazul spermatozoizilor umani și raportată pentru prima dată în 2005 [Truța Z et al., 2005].

Carburantul biologic ATP este consumat de către celulele haploide atât pentru producerea de energie mecanică cât și pentru necesarul energetic al reacțiilor metabolice. ATP-ul extracelular crește potențialul de fertilizare și motilitatea spermatozoizilor [Rossato M et al., 1999]. Pentru generarea mișcării ATP-ul este consumat cu ajutorul catalizatorului de dineină axonemală ATP-aza [Cao W et al., 2006]. Atunci când concentrația de carburant biologic ATP în lichidul seminal este mai ridicată și mișcarea cozii celulelor este mai amplă. Comportamentul bioenergetic al celulelor haploide masculine umane poate fi înțeles dacă corelăm substratul bioenergetic primar, glucoza, cu producția de carburant biologic ATP și cu producerea de mișcare mecanică, prin consumul de ATP.

Un caz aparte îl reprezintă condițiile de ZMF, motiv pentru care am conceput acest studiu, alegând celulele haploide ca fiind unele dintre cele mai complexe celule pe care corpul uman le generează. Am sugerat explicarea primară a influenței ZMF asupra

spermatozoizilor umani [Truța Z et al., 2005; Truța Z et al., 2006] având în vedere un studiu mai complet care a luat în calcul glucoza ca parametru bioenergetic de pornire, și parametrii de motilitate ca parametri finali de studiu [Truța Z et al., 2010, Truța Z et al., 2011].

Studiul nostru a fost conceput cu scopul de a determina efectele ZMF asupra consumului de glucoză a spermatozoizilor umani, și asupra parametrilor motilității și viabilității acestor celule, ca parametri principali în estimarea fertilității masculine.

METODE EXPERIMENTALE

OBȚINEREA PROBELOR ȘI PROTOCOLUL DE MANIPULARE

Probele biologice utilizate au fost donate la Laboratorul IVF de la Clinica de Ginecologie Cluj. Probele au fost obținute prin ejaculare, urmând procedeul recomandat de World Health Organization [WHO, 2001]. Fiecare probă a fost observată microscopic, numărată, marcată și împărțită în două eșantioane. Un eșantion a fost expus în ZMF iar celălalt în GMF ca și probă de control.

Pentru fiecare probă s-au efectuat câte 10 măsurători pe cantități de 5μl. Procedeul de categorisire s-a efectuat prin numărare în camera Makler. Pentru a avea aceleași condiții de temperatură am păstrat proba și proba control în aceeași cameră (au existat variații mici de temperatura, $22^{\circ}\text{C} \pm 0.3^{\circ}\text{C}$). Timpul maxim de expunere a fost considerat 72 ore. După măsurătorile de numărare, motilitate, înregistrare PC și spectrofotometrie, toate probele au fost distruse urmând protocolul de distrugere a probelor biologice.

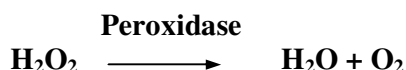
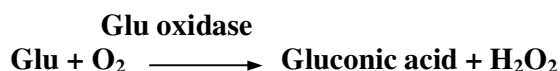
Nici o probă nu a fost folosită după expunere în câmp magnetic pentru orice alte studii, IVF sau inseminare.

Pentru numărare am folosit metoda Makler pentru spermatozoizi [Makler A et al., 1978]. Am folosit notarea specifică cunoscută pentru motilitatea celulelor (celule rapid progresive, celule încet progresive, celule imobile %) pentru caracterizarea tuturor probelor folosite în studiu.

Procentajul de celule rapid progresive (RP) se determină prin împărțirea numărului de celule ce se mișcă cu o viteză VAP mai mare de 25μm/s, la numărul total de celule. Similar concentrația de celule încet progresive (SP) se determină împărțind numărul celulelor ce se mișcă cu o viteză mai mică de 25μm/s, la numărul total de celule [WHO, 2001].

METODA DE OXIDAZĂ A GLUCOZEI (GO)

Metoda GO se bazează pe reacțiile:



Acceptorul de oxigen cromogenic reacționează cu peroxidul produs, și formează o culoare proporțională cu concentrația de glucoză în proba de lichid seminal.

De menționat că pentru verificarea acceptorului de oxigen am folosit inițial probe de glucoză pură diluată la concentrații cunoscute. Pentru pregătirea probelor s-a folosit o balanță Kern, cu eroarea de măsură de 0.1mg. Un laborant și un biolog au efectuat aceleași teste separate, iar rezultatele au fost aceleași.

METODA SPECTROSCOPICĂ ULTRAVIOLET-VIZIBIL (UV-VIS)

Spectrofotometria UV-VIS este o tehnică analitică fundamentală, care împreună cu accesoriile specifice, este folosită în laboratoare pentru măsurători de absorbție și transmisie în toate domeniile de aplicație. Metodele spectrofotometrice măsoară componentele relative, în comparație cu componentele absolute, care sunt dificil de măsurat, și depind de tehnica de măsurare folosită. Am folosit un spectrofotometru UV-VIS JASCO 530 cu două cuve identice, una pentru probă și una pentru referință, la care am raportat. Pentru a evita erorile cauzate de apa distilată din cuva de referință, am obținut spectrul UV-VIS al apei distilate și l-am extras prin diferențiere din spectrele de interes.

METODA DE ANALIZĂ A SPERMEI ASISTATĂ PE COMPUTER (C.A.S.A.), DETERMINAREA PARAMETRIILOR MOTILITĂȚII ȘI VELOCITĂȚII

Pentru determinarea vitezei în linie dreaptă (VAP) și a vitezei curbilinare (VCL) am folosit metoda C.A.S.A. modificată de noi pentru eficiență. Au fost determinați parametrii uzuali standard medii ai motilității și vitezei [Fletcher DA și Theriot JA, 2004]. Pentru verificare am determinat scara de măsură în pixeli pentru ecranul monitorului folosit, cu ajutorul gridurilor Makler (620:1 pe Toshiba, și 2480:1 cu zoom, 1358:1 pe Sony).

VAP a fost determinat pentru toți spermatozoizii vizualizați pentru cel puțin 10 ridicări foto consecutive (20-30 celule), din cel puțin 5 locații diferite ale camerei de numărare Makler pentru una și aceeași probă, la un timp de măsurare. Această metodă dă un total de 100-150 celule folosite la un timp de măsurare stabilit.

Vizualizarea a fost făcută simultan pe un TV Emerson, și printr-un tuner analog-digital PCTV, de la aceeași cameră CCD, pe computerul Toshiba. Pentru fiecare set de măsurători au fost calculate statistica și erorile. Erorile medii de determinare au fost calculate și rezultatele prezentate sunt semnificative la nivelul $p < 0.05$.

COMPENSAREA GMF ȘI EXPUNEREA PROBELOR

Am construit un dispozitiv pentru a crea câmp magnetic continuu, format dintr-un set de bobine Helmholtz (Fig.5), și două baze dreptunghiulare din polistiren estrudat ca și suport. Baza exterioară a bobinelor (bază suport) a fost construită pentru a fi menținută orizontală și a fi marcată între anumite limite dispuse convenabil în raport cu spațiul ales pentru expunerea de probe.

Baza interioară a bobinelor (bază de expunere) a fost elevată printr-un set de suporti din polistiren estrudat, pentru a asigura stabilitatea probelor în mijlocul geometric aproximativ și paralelismul dintre baza suport și baza de expunere. Elevarea bazei interioare a fost făcută prin suprapunerea câtorva baze paralelipipedice nemagnetice, din același material.

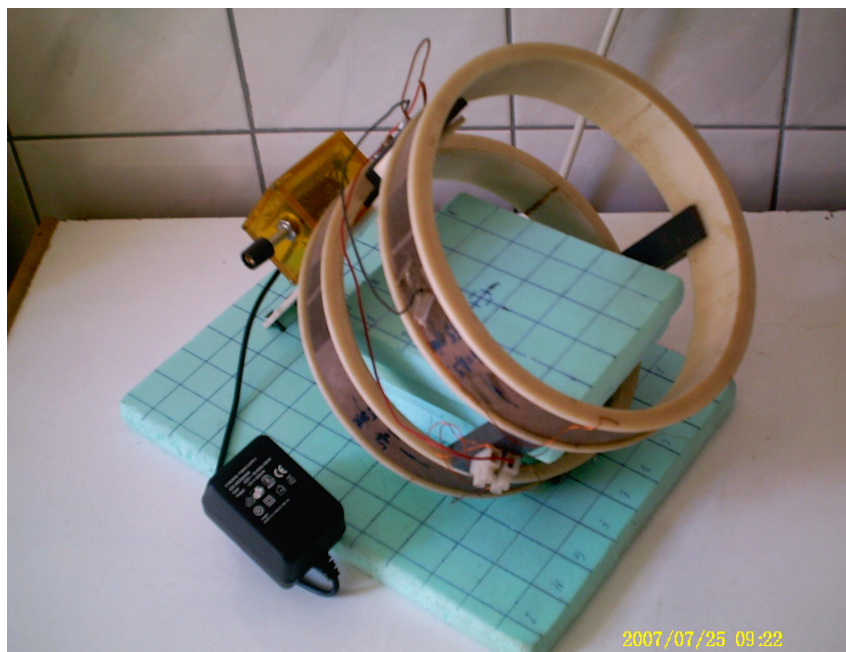


Fig.5 Dispozitiv pentru compensarea câmpului magnetic terestru

Planele bobinelor pot fi înclinate la un unghi mai mare de 45 de grade hexagesimale. În combinație cu rotirea bazei suport, și inversarea sensului curentului în bobine se asigură crearea unui câmp magnetic continuu de orice orientare spațială dorită. Odată ce obținem orientarea dorită, colțurile bazei suport se marchează pe locul ales pentru expunere.

Ca și sursă de tensiune am folosit un redresor cu filtrare Nokia cu alimentarea la 220V tensiune alternativă de rețea tip Europa, și ieșirea în 12V curent continuu la 0.5A. În circuitul de ieșire am introdus un reostat cu cursor și extrafiltrare pentru ajustarea curentului ce trece prin bobine. Bornele tensiunii continue se pot interschimba, schimbând astfel sensul curentului prin bobine și sensul câmpului magnetic creat de bobine.

O hartă magnetică spațială a fost determinată pe suprafața de expunere, în interiorul bobinelor, cu ajutorul aparatului Fluxmaster, determinând componenta verticală și orizontală a inducției magnetice de-a lungul marcajelor de pe baza de expunere, prin determinări succesive în spațiul de interes.

Pe baza de expunere a aparatului construit de noi, se obține câmp magnetic cu densitatea de flux magnetic variind 300nT/25mm, în plan orizontal. Această variație a densității de câmp magnetic pe suprafața de expunere de 60nT/5mm este acceptabilă, deoarece eprubetele folosite aveau un diametru de 5mm și nu am expus mai mult de 4 probe la un set de măsurători. Fiecare probă expusă a avut volumul minim de 10 μ L. Prin urmare variația densității fluxului câmpului magnetic între probele expuse compact, este mai mică decât eroarea propusă de compensare a câmpului magnetic (150nT). Omogenitatea câmpului obținut dă erori mai mici de 0.3 %, erori pe care nu le-am depășit la expunerea probelor.

Am dorit ca influențe aleatorii cotidiene să fie identice pentru probele expuse în ZMF și pentru probele expuse în GMF, pentru a nu avea diferențe relative datorate radiațiilor electromagnetice (EMF) sau radiațiilor electromagnetice de frecvență redusă (ELF). Ne-am asigurat astfel că diferențele ce apar între probele expuse în GMF și cele expuse în ZMF sunt efectul anulării câmpului GMF, și nu al anihilării influențelor câmpurilor variabile uzuale cotidiene. De asemenea au fost eliminate toate sursele posibile de radiații EMF, ELF sau radio și TV din apropierea locului de expunere.

METODE STATISTICE ȘI ANALIZA STATISTICĂ A REZULTATELOR

Măsurătorile repetate au fost analizate folosind softul de statistică SPSS 13.0 pentru Windows (SPSS Inc, Chicago, Ill) și One way-ANOVA pentru Origin 6.1. Rezultatele de la numărările Makler nediluate și de la Makler 1:1 au fost testate sistematic pentru corelare

absolută folosind Intraclass Correlation Coefficients (ICC), și modelul de efect dublu. Numărările repetate pentru fiecare probă ar trebui să dea aceleași valori. Cu cât valoarea ICC este mai apropiată de 1, cu atât metoda este mai fiabilă. Coeficienții de variație (CV) au fost deasemenea calculați inițial pentru a determina împrăștierea rezultatelor față de valoarea medie pentru fiecare metodă.

Pentru identificarea picului de glucoză (GUV) din spectrul UV-VIS al probelor de lichid seminal uman, am ales 3 teste statistice: Independent t-Test, One-way ANOVA, Regresii multiple. Testele se pot aplica la două seturi de date independente și care au o distribuție normală. Testul Independent t-Test a fost folosit sub forma testului la două populații t-Test. Toate aceste trei teste pot fi folosite pentru a afla dacă seturile de date au sau nu același tip de variație (sau distribuție de la caz la caz), și dacă pe același interval considerat au sau nu aceleași valori medii.

La folosirea metodelor coloana "Prob > F" dă posibilitatea obținerii statistice a valorii F mai mare decât cea listată pentru regresie. În aplicațiile uzuale acest număr este 0.05, sau mai puțin. Acesta este standardul unanim acceptat în lucrările științifice. R^2 statistic măsoară variabilitatea în datele la care se aplică (și se poate explica cu) un model liniar. R^2 ia valori de la 0 la 1.

La toate testele și analizele statistice efectuate am impus nivelul minim de confidență de 95%. La controlul picurilor specifice Raman am folosit pentru identificarea substraturilor câte două din testele enumerate.

Pentru măsurătorile parametrilor de motilitate a fertilității (VAP, VCL, LIN, ALH, BCF) rezultatele prezentate sunt semnificative statistic la nivelul $p < 0.05$.

INFLUENȚELE CÂMPURILOR MAGNETICE ASUPRA CELULELOR

MECANISME DE INTERACȚIUNE

Mecanismele de interacțiune a câmpului magnetic static cu celulele vii poate fi explicat parțial la această dată în câteva moduri [WHO, 2006]:

- interacțiunea electrodinamică cu curenții ionici de conducție. Curenții ionici de conducție interacționează cu câmpul magnetic prin intermediul forțelor Lorentz ce se exercită asupra purtătorilor de sarcină în mișcare. Aceste efecte duc la inducția curenților și schimbărilor de potențial electric. Schimbările de potențial electric sunt asociate în general cu contracții ventriculare inhibitoare.

- efectele magnetomecanice, incluzând orientarea structurilor magnetice anizotrope în câmpuri statice și translatarea materialelor feromagnetice și paramagnetice în gradient de câmp. Forțele și momentele structurilor endo și exocelulare sunt mecanisme de interacție inhibitoare.

- efectele câmpului magnetic asupra stărilor spinilor electronici ai intermediarilor de reacție. Multe clase de reacții organice pot fi influențate semnificativ de către câmpuri magnetice de la 10 la 100mT ca rezultat al efectelor pe stările spinilor electronici ai intermediarilor de reacție. O pereche de spini corelată radical se poate recombina și împiedică formarea unui produs de reacție în două situații ce pot fi influențate de câmpul magnetic:

- trecerea de la o stare de triplet la o stare de singlet.
- radicalii trebuie să se întâlnească fizic pentru a reacționa. Aceasta poate înhîba reacțiile enzimatic, și ca urmare lanțurile metabolice.

Mecanismele de interacțiune ale câmpului magnetic variabil (câmp electromagnetic) cu celulele vii este explicat pe baza energiei pe care unda o poartă. Frecvența de emisie a unei surse este cea care dictează tipul de interacțiune cu materia organică.

Radiații Electromagnetice → Ionizante → γ , X, UV-înalte (Ionizarea compuşilor)

→Neionizante→UV-joase, VIS, IR (Excitare electronică)

→ RF, MF, ELF, SF (Inducere de curenți)

La frecvențe sub frecvențele RF modulate în amplitudine (AM), de aproximativ 10^6 Hz, radiațiile electromagnetice se cuplează slab cu materia organică, deci efectele datorate frecvenței unei de frecvențe extreme joase (ELF) sunt mai scăzute. Aici ele trebuie să țină cont și de componenta statică a câmpului, și ca urmare și de mecanismele explicate mai sus [Moulder JE și Foster KR, 1995]. Câmpurile magnetice sunt dificil de ecranat, ele pătrund ușor chiar prin clădiri, cu atât mai mult prin materia organică (în parte, corpul uman). În contrast, câmpurile electrice au o abilitate mică de a pătrunde prin clădiri și materie organică.

Deoarece câmpurile electrice statice nu pătrund adânc prin corpul uman este normal să credem că orice efect biologic legat de câmpuri statice trebuie să se datoreze câmpurilor magnetostatice [Kowalczyk CI, 1991; Miller G, 1987]. Se pune întrebarea cât de mult putem suporta din aceste radiații fără să avem probleme de sănătate ireversibile. Institutul National American de Standards (ANSI) a standardizat ca maximă doza de 0.4 W/kg pentru rata de absorbție specifică (SĂR) [ANSI, 1982].

INFLUENȚELE RADIAȚIILOR ELECTROMAGNETICE (EMF) GENERALE ASUPRA CELULELOR HAPLOIDE

Telefoanele mobile sunt indispensabile în prezent. Ele emit însă la funcționare radiații electromagnetice ce pot fi nocive pentru celule, în particular pentru celulele haploide masculine. Telefoanele industriale cu difuzoare produc o densitate de flux magnetic de 0.3-1.0mT la suprafață.

S-au constatat creșteri semnificative la parametri de motilitate la expunerea în câmp magnetic pulsativ cu forma pătrată a pulsurilor, la 50Hz și de intensitate de 5mT. La o densitate a fluxului magnetic de numai 2.5mT, pentru același tip de influențe, efectele nu au fost semnificative [Iorio R et al., 2006]. ELF nu induce aberații cromozomiale sau mutații, la nivelul acizilor nucleici [Hiroyuki T et al., 1998].

Studii care au luat în considerare spermatozoizii umani au determinat că atât ELF cât și radiațiile RF cauzează reducerea capacității de fertilizare și a motilității acestor celule [Makler A, 1980; De Vita R, 1995]. Undele sinusoidale cu o frecvență de 50Hz nu afectează însă morfologia structurală a celulelor umane in vitro [Supino R et al., 2001].

INFLUENȚELE CÂMPULUI MAGNETIC STATIC (SF) ASUPRA CELULELOR HAPLOIDE

Câmpurile magnetice statice sunt caracterizate de tăria câmpului magnetic H , $< A/m >$ și densitatea fluxului magnetic B , $< T = Wb/m^2 >$ aproximativ constante în timp. Pământul produce un câmp magnetic terestru de 35 μ T la ecuator, și 70 μ T la poli. Intensitatea câmpului electric terestru este de aproximativ 130V/m la nivelul mării, și 45V/m la 1.000m altitudine.

Efectele biologice sunt influențate de câmpul magnetic efectiv care se aplică la locul expunerii. Studiul computațional face legătura între câmpul magnetic static exterior și câmpul electric și curenții induși intern datorat cauzei mișcării materiei organice în acel câmp magnetic. În cazul spermatogenezei și spermatozoizilor umani in vivo, câmpul magnetic ce se aplică la nivelul testisului are aproximativ același ordin de mărime ca și câmpul magnetic exterior ceea ce face ca efectele biologice să fie mai pronunțate la aceste tipuri de celule.

Cele mai mari câmpuri magnetice statice la care se expune publicul sunt generate de sistemele de imagine rezonanță magnetică (MRI). Un calcul teoretic computațional arată că în acest caz publicul este expus la un câmp magnetic static cu densitatea de flux a câmpului de 1.5 – 4T [Kowalczyk CI, 1991; Stuchly MA, 1986]. Muncitorii care produc aluminiu sunt expuși la câmpuri de 5 – 15mT [NIOSH, 1994].

Un alt tip de efect biologic este orientarea spermatozoizilor în câmp magnetic static. Există lucrări unde se raportează o orientare de 100% a celulelor haploide masculine la mamifere (tauri) la un câmp magnetic static puțin sub 1T. Efectul biologic al câmpului magnetic static de orientare a celulelor haploide masculine este mult mai pronunțat în comparație cu eritrocitele și majoritatea tipurilor de celule somatice [Emura R et al., 2001].

Un alt studiu arată că expunând spermatozoizii mamiferelor (șoareci în acest caz) la 0.7 T între 1 și 24 ore pe durata a 35 zile spermatozoizii se dezvoltă cu mai multe anomalii la cap, dar nu apar schimbări semnificative la coadă [Tablado et al., 1998].

Tot la șoareci la o expunere de numai 30min/zi se reduce cantitatea de spermă testiculară [Narra V.R. et al., 1996]. Până și o expunere a spermatozoizilor la numai 5nT are ca rezultat creșterea numărului de spermatozoizi adulți anormali [Asashima M et al., 1991].

Pentru alte tipuri de animale există studii care raportează efecte negative la expunerea animalelor la un câmp SMF cu o valoare a densității de flux magnetic de 20mT. La o expunere de numai 30 min./zi pe durata a două săptămâni numărarea spermei s-a modificat drastic, cu până la 89.9%, iar motilitatea spermatozoizilor a scăzut cu 96.54% [Ramadan LA et al., 2002].

INFLUENȚELE GMF ASUPRA CELULELOR HAPLOIDE

Câmpul geomagnetic terestru (GMF) este un câmp magnetic aproape staționar. Prin urmare toate efectele descrise la capitolul anterior se manifestă la celulele haploide, relativ la densitatea fluxului magnetic terestru.

GMF se aplică neîncetat oamenilor de pe Terra spre deosebire de sursele artificiale care influențează numai anumite locații, și se aplică temporar. Sursele artificiale de câmp magnetic foarte puternice influențează marea masă a publicului foarte rar.

Efectul GMF se cumulează în timp. Astfel, deși corpul uman a învățat să trăiască în aceste condiții de mediu, ele nu pot fi neglijate, cu atât mai mult cu cât ele se schimbă în timp și trebuie să ne punem întrebarea cum va răspunde organismul uman la aceste schimbări.

Spermatozoidul uman este o celulă anizotropă și asimetrică, ce conține structuri macromoleculare diamagnetice (proteine structurale și proteinele de dineină ce formează motorul molecular) și acizi nucleici [Ying J et al., 2007; Alberts B et al., 2002]. Aceste structuri macromoleculare tind să se orienteze în câmp magnetic, deci sunt influențate de câmpul GMF, care devine astfel un factor de stres pentru motilitatea acestor tipuri de celule.

BAZA SPECTRALĂ A LICHIDULUI SEMINAL UMAN

S-au extras spectrele UV-VIS din probe 1:5 diluate, pentru toți componenții biochimici cu concentrație semnificativă ($> 5\text{mg}/100\text{mL}$) din lichidul seminal uman [C.MUKAI et al. 2004]. Concentrațiile probelor componentelor pregătiți artificial, au fost respectate așa cum s-a găsit în literatura din cea mai nouă lucrare de sinteză din domeniu la data experimentelor [C.MUKAI et al. 2004]. Este de amintit că limita de detecție a componentelor biochimici din lichidul seminal uman este de $5\text{mg}/100\text{mL}$.

Intensitatea absorbției relative (RAI) a fost măsurată în modul Abs al spectrofotometrului Jasco 530 folosit. Am ales diluția 1:5 ca optimă. Având în vedere că în UV-VIS anumite picuri se suprapun parțial, am obținut spectrele componentelor majoritari ai lichidului seminal [Owen D.H., Katz D.F, 2005] și le-am eliminat prin diferențiere în Origin contribuțiile valorilor Abs la locul picului clar al glucozei.

De asemenea unii componenți biochimici ai lichidului seminal uman au benzi de absorbție suprapuse și un spectru UV-VIS bine definit, însă sub lungimea de undă de 250 nm , și ca atare nu influențează măsurătorile ce vizează picul UV-VIS al glucozei de la 267 nm . Prezentăm ca exemplu citratul (Fig.6). Banda de absorbție UV-VIS cea mai apropiată de picul glucozei pe care am găsit-o experimental a fost cea a fructozei. Fructoza are o bandă de absorbție clară cu un pic la 286 nm (Fig.6). Fructoza pură folosită pentru ridicarea graficului are un spectru foarte clar, unanim acceptat în studii.

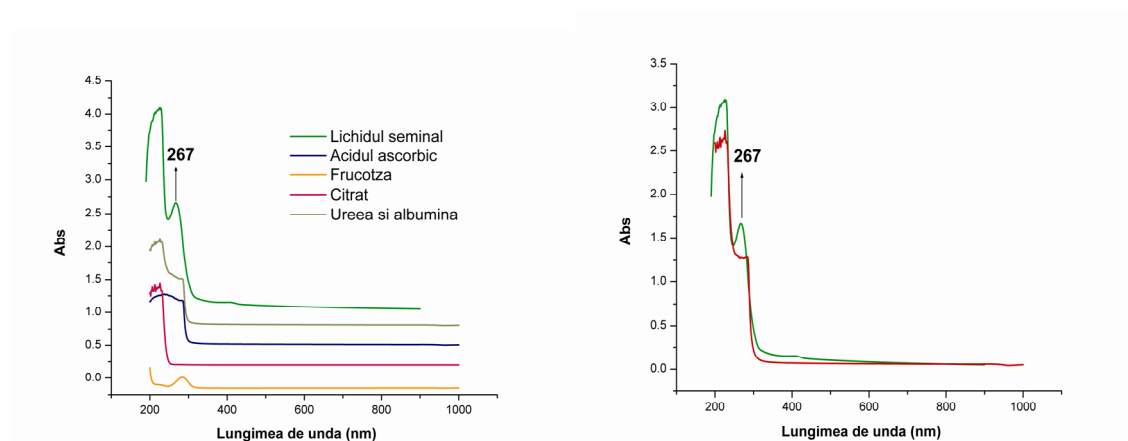


Fig.6 Spectrele UV-VIS ale lichidului seminal , și a componentelor biochimici ai lichidului seminal ce au o contribuție semnificativă la baza spectrală, diluate 1:5 (stânga). Baza spectrală totală UV-VIS a lichidului seminal uman (72, 0, 28%)(roșu) determinată grafic (Origin6.1), și spectrul UV-VIS al aceleași probe (verde), la diluția 1:5.

Rezultatele amintite nu au fost obținute în prealabil în lichidul seminal, dar în condiții similare de pH>7 [Kubota H et al., 1976; Yordanov ND et al., 2004]. Baza spectrală UV-VIS a lichidului seminal uman în jurul valorii de 267nm, are ca și componenți spectrali semnificativi numai albumina, ureea, acidul ascorbic, citratul și fructoza (Fig.6).

Fitarea la scară a spectrelor UV-VIS a componenților biochimici din lichidul seminal uman, care au o contribuție spectrală semnificativă în jurul valorii de 267nm și suma lor spectrală (Origin 6.1), arată că baza spectrală a lichidului seminal poate fi aproximată acceptabil (Fig.6).

Sugerăm că diferența dintre baza spectrală totală UV-VIS a lichidului seminal uman (72, 0, 28%), și spectrul UV-VIS al aceleași probe la lungimi de undă mai mici de 250nm, se datorează proteinelor minoritare din lichidul seminal uman. Oricum ele nu influențează extragerea grafică a picului glucozei de la 267nm (Fig.6).

DETERMINAREA CONCENTRAȚIEI INIȚIALE A GLUCOZEI ÎN PROBELE ANALIZATE. METODA PROPRIE DEZVOLTATĂ PE BAZA PICULUI UV-VIS AL GLUCOZEI (GUVV)

Nici un alt component biochimic al lichidului seminal, cu excepția glucozei, nu are o bandă de absorbție UV-VIS în jurul valorii de 267nm (vezi capitolul anterior “Baza spectrală a lichidului seminal”). Prezentăm banda de absorbție UV-VIS cu picul clar al glucozei de la 267nm (Fig.7).

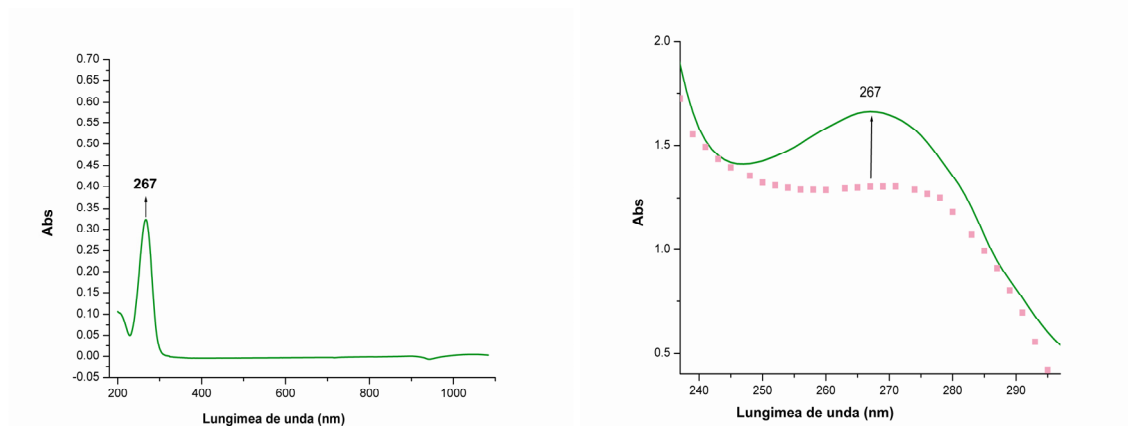


Fig.7 Spectrul UV-VIS al unei soluții de glucoză pură în concentrație de $55 \pm 1 \text{ mg}/100 \text{ mL}$ distilată 1:5 în apă distilată (stânga). Polinomul de regresie (plum punctat) de gradul 3 corespunzător bazei spectrale a lichidului seminal uman pentru o probă sănătoasă (72, 0, 28%) diluată 1:5

Ecuția corespunzătoare fitării regresive care aproximează cel mai bine baza spectrală UV-VIS, în aria de interes (230nm la 300nm), este:

$$Y = 452.71657 - 5.17716 X + 0.01979 X^2 - 2.51964E -5 X^3 \quad [3]$$

În care X este valoarea numerică a lungimii de undă, iar Y este valoarea Abs corespunzătoare fitării regresiale punct cu punct.

Din ecuația [3] și Fig.7 picul UV-VIS al glucozei de la 267nm (GUVP) poate fi extras simplu folosind analiza de diferențiere din Origin 6.1 (Fig.7). Pentru a fi siguri că picul pe care îl măsurăm este într-adevăr picul GUVP, am comparat și analizat picul glucozei pure diluate 1:5 (Fig.7), cu picul de la 267nm extras din spectrul UV-VIS al probei de spermă considerate (Fig.7).

Coeficientul de determinare rezultat este 0.963 (Tab.2). Din compararea punct cu punct a picului glucozei pure diluată 1:5 (Fig.7), cu picul de la 267nm extras din spectrul UV-VIS al probei de spermă considerate (Fig.7), rezultă identificarea clară a picului GUVP în lichidul seminal uman (Tab. 1).

Parametru/ Metoda	Independent t-Test	One-way ANOVA	Multiple Regression
p	0.27754	0.27754	0.027754
t	-1.10166	-	-
F	-	1.21364	1.21364
R² (COD)	-	-	0.96335
Prob>F	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Concluzia finală	acelasi pic	acelasi pic	acelasi pic

Tab.1 Comparare între picul de la 267nm extras dintr-o probă de spermă (72, 0, 28%), și GUVP extras din spectrul UV-VIS al glucozei pure în concentrație de $55 \pm 1 \text{ mg/100mL}$, diluate 1:5

Pentru a obține un grafic de calibrare a concentrației glucozei în funcție de valoarea intensității absorbției relative Abs, am măsurat absorbția glucozei pure la 267nm, la 5 concentrații diferite, respectând diluția la care am conceput studiul, de 1:5 (Fig.8).

Am determinat un grafic de calibrare a absorbției relative în funcție de concentrația probei de glucoză în intervalul de concentrație de la $10 \pm 1 \text{ mg/100mL}$ la $140 \pm 1 \text{ mg/100mL}$.

Graficul de calibrare rezultat poate fi fitat liniar cu ecuația:

$$y = (5.7211 E-3) x + 3.6226E-5 \quad [4]$$

În care x reprezintă valoarea concentrației glucozei, iar y este valoarea intensității absorbției relative a picului glucozei de la 267nm pentru aceeași probă. De menționat că s-au folosit unitățile de măsură a concentrației specifice acestor tipuri de determinări unanim acceptate, la diluția 1:5, fără a schimba nici o proporție, sau valoare Abs.

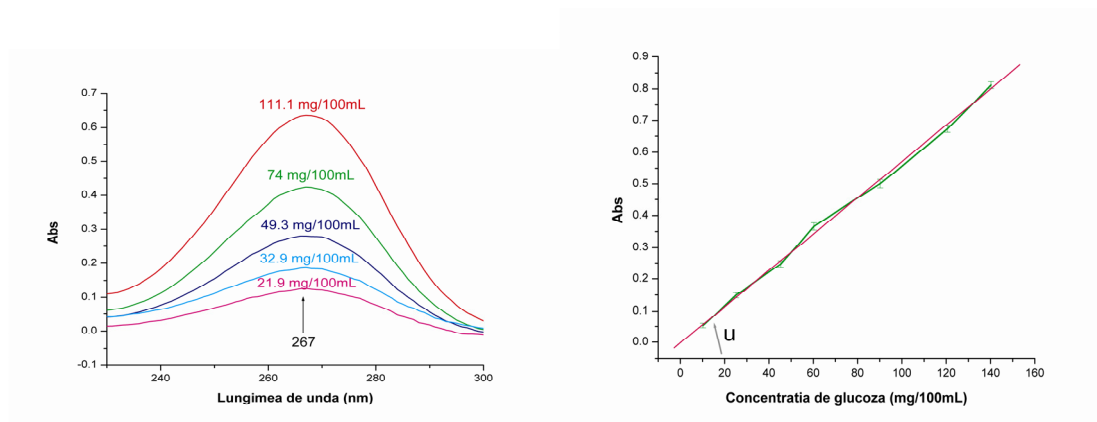


Fig.8 *GUVP al glucozei pure, diluată 1:5 la concentrațiile arătate. Fitarea liniară a scării de concentrație rezultată prin reprezentarea grafică a valorii absorbției relative UV-VIS ca funcție de concentrația glucozei diluată 1:5 la 267nm (dreapta).*

Dacă neglijăm cel de-al doilea factor în ecuația [4], din graficul de calibrare (Fig.8) rezultă:

$$x = y \text{ ctg } u \quad [5]$$

În ecuația [4] eroarea de fitare a primului coeficient este $\pm 0.02413 \text{ E-3}$.

Coeficientul de determinare al fitării liniare a graficului de calibrare liniară este $R^2=0.99864$, iar graficul de calibrare este semnificativ la nivelul $p < 0.05$ (Fig.8).

În ecuația [5] u este definit ca unghiul dintre dreapta graficului de calibrare a glucozei, și axa OX (Fig.29). Ecuația [4] poate fi aplicată la soluții diluate 1:5 de lichid seminal uman, în apă distilată, în limitele de concentrație a glucozei, pentru care a fost dedusă scara de calibrare ($10 \pm 1 \text{ mg/100mL}$ to $140 \pm 1 \text{ mg/100mL}$). Din ecuațiile [4] și [5] rezultă:

$$\text{ctg } u = 174.7915 \quad [6]$$

Din ecuațiile [5] și [6], putem determina concentrația glucozei x în funcție de valoarea numerică a absorbției relative UV=VIS al GUVP, la 267nm y :

$$x = 174.7915 y \quad [7]$$

Ecuația [7] este semnificativă la nivelul $p < 0.05$ și rezultatele pentru concentrația totală de glucoză în sperma umană, sunt în unitățile uzuale pentru acest tip de studii, mg/100mL .

Graficul de calibrare a fost determinat pentru sperma umană naturală diluată 1:5 în apă distilată, fără nici un fel de conservanți, sau produse chimice de stimulare. Am folosit metoda GUVP pentru a determina concentrația totală de glucoză în probele de spermă umană. S-a ales un grup de 30 de donori sănătoși și fertili.

Rezultatele obținute sunt prezentate pentru ilustrare în (Tab.2). Am obținut pentru valoarea medie a concentrației glucozei în sperma umană sănătoasă valoarea de 47.17 ± 4.13 mg/100mL ($p < 0.05$, $R^2 = 0.9801$) (Tab.2). Pentru a valida metoda am determinat concentrația glucozei în 30 de probe recoltate de la donori sănătoși (Tab.2). Rezultatele au fost comparate cu cele obținute prin metodele biochimice de control (tabel neprezentat).

Proba	RP, SP, I (%)	Valoarea numerică a GUV (Abs value $\pm$ SD)	Concentrația glucozei (mg/100 mL)
1	72, 0, 28	0.32832 $\pm$ 0.01429	57.3 $\pm$ 2.7
2	60, 9, 31	0.25339 $\pm$ 0.01147	44.2 $\pm$ 2.3
3	61, 10, 29	0.25911 $\pm$ 0.01236	45.2 $\pm$ 2.4
4	54, 22, 24	0.26712 $\pm$ 0.01161	46.6 $\pm$ 2.3
5	59, 11, 30	0.23795 $\pm$ 0.01212	41.5 $\pm$ 2.4
6	63, 21, 16	0.27742 $\pm$ 0.01326	48.5 $\pm$ 2.6
7	64, 15, 21	0.27227 $\pm$ 0.01291	47.5 $\pm$ 2.5
8	52, 27, 21	0.25968 $\pm$ 0.01257	45.3 $\pm$ 2.4
9	57, 16, 27	0.23966 $\pm$ 0.01269	41.8 $\pm$ 2.5
10	59, 11, 30	0.28771 $\pm$ 0.01007	50.2 $\pm$ 2
11	70, 5, 25	0.30831 $\pm$ 0.01402	53.9 $\pm$ 2.7
12	66, 8, 26	0.27914 $\pm$ 0.01345	48.8 $\pm$ 2.7
13	71, 9, 20	0.32147 $\pm$ 0.01421	56.2 $\pm$ 2.7
14	60, 13, 27	0.23796 $\pm$ 0.01367	41.6 $\pm$ 2.7
15	53, 29, 18	0.26027 $\pm$ 0.01215	45.5 $\pm$ 2.4
16	57, 14, 29	0.27914 $\pm$ 0.01238	48.8 $\pm$ 2.4
17	56, 20, 24	0.27171 $\pm$ 0.01326	47.5 $\pm$ 2.7
18	57, 18, 25	0.24941 $\pm$ 0.01163	43.6 $\pm$ 2.3
19	50, 21, 29	0.24253 $\pm$ 0.01369	42.4 $\pm$ 2.7
20	59, 6, 35	0.29574 $\pm$ 0.01146	51.7 $\pm$ 2.3
21	58, 11, 31	0.28201 $\pm$ 0.01451	49.3 $\pm$ 2.8
22	64, 26, 10	0.27229 $\pm$ 0.01254	47.6 $\pm$ 2.4
23	69, 8, 23	0.27286 $\pm$ 0.01362	47.7 $\pm$ 2.8
24	67, 2, 31	0.29288 $\pm$ 0.01268	51.2 $\pm$ 2.5
25	63, 14, 23	0.26313 $\pm$ 0.01436	46 $\pm$ 2.8
26	54, 11, 35	0.25284 $\pm$ 0.01166	44.2 $\pm$ 2.3
27	51, 27, 22	0.23969 $\pm$ 0.01364	41.9 $\pm$ 2.6
28	69, 7, 24	0.30032 $\pm$ 0.01329	52.5 $\pm$ 2.6
29	62, 6, 32	0.26944 $\pm$ 0.01037	47.1 $\pm$ 2.1
30	51, 17, 32	0.22657 $\pm$ 0.01114	39.6 $\pm$ 2.2

Tab.2 Concentrația de glucoză (coloana 4) din sperma umană cu parametrii (RP, SP, I) (coloana 2) obținută pentru probele (coloana 1) sănătoase. Valoarea absorbției relative a picului GUV de la 267nm este arătată (coloana 3).

Neglijarea celui de-al doilea termen în ecuația [3], dă un sens fizic ecuației: pentru o concentrație de zero a glucozei, avem o absorbție relativă de zero la 267nm. Eroarea asociată

cu neglijarea celui de-al doilea termen este de 0.00633mg/100mL, care este nesemnificativă, mult sub limita de detecție a oricărei metode de detecție a glucozei cunoscute în prezent. Metoda GUVF a fost validată prin raportarea acestor rezultate [Truța Z et al., 2010].

VARIAȚIA ÎN TIMP A PROCENTAJELOR RAPID ȘI LENT PROGRESIVE EXPUSE ÎN GMF

Prezentăm procentajul celulelor rapid și lent progresive în totalul de celule haploide masculine, pe durata a 30 ore expunere în GMF. Aceste experiențe au fost făcute in vitro la temperatura de $22 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$. În primul grafic s-a colectat proba de la un donator foarte fertil, în al doilea grafic de la un donator cu caracteristici de normozoospermie. Toate măsurătorile de concentrație, efectuate la un moment dat, au eroarea relativă medie de 2%, rezultată din tipul de metodă adoptată [Makler, 1978].

Se observă că tendința generală este ca după trecerea unei perioade de timp concentrația de spermatozoizi rapid progresivi să descrească (Fig.9), iar cea de lent progresivi să crească și apoi după ce atinge un maxim să descrească, în perioada de timp în care proba este viabilă. S-a sugerat că această creștere a concentrației de spermatozoizi lent progresivi se face pe seama spermatozoidelor rapid progresivi, care cu trecerea timpului devin încet progresivi [Truța Z et al., 2006].

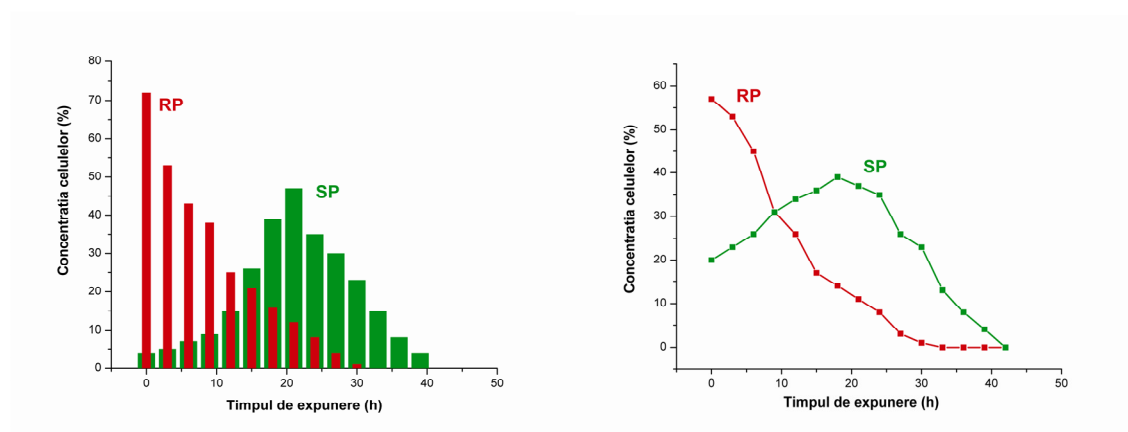


Fig.9 Variația procentajului spermatozoidelor rapid (roșu) și lent (verde) progresivi într-o probă foarte fertilă (72, 4, 24%) cu 31 mil/ml expuși în GMF (stânga). Variația procentajului spermatozoidelor rapid (roșu) și lent (verde) progresivi într-o probă normală (57, 20, 23%) cu 26mil/ml, expusă în GMF.

În cele 2 cazuri considerate procentajul de spermatozoizi imobili se poate găsi ușor prin normare. Spermatozoizii viabili neprogresivi nu prezintă interes practic pentru fertilizare in vitro sau inseminare, decât în cazurile deosebite pentru donorii la care toți spermatozoizii sunt viabili dar neprogresivi, iar informația ADN este intactă.

INFLUENȚELE ZMF ASUPRA CELULELOR HAPLOIDE

INFLUENȚA TEMPERATURII ASUPRA VELOCITĂȚII ÎN LINIE DREAPTĂ (VAP) ȘI VIABILITĂȚII CELULELOR HAPLOIDE MASCULINE UMANE ÎN ZMF

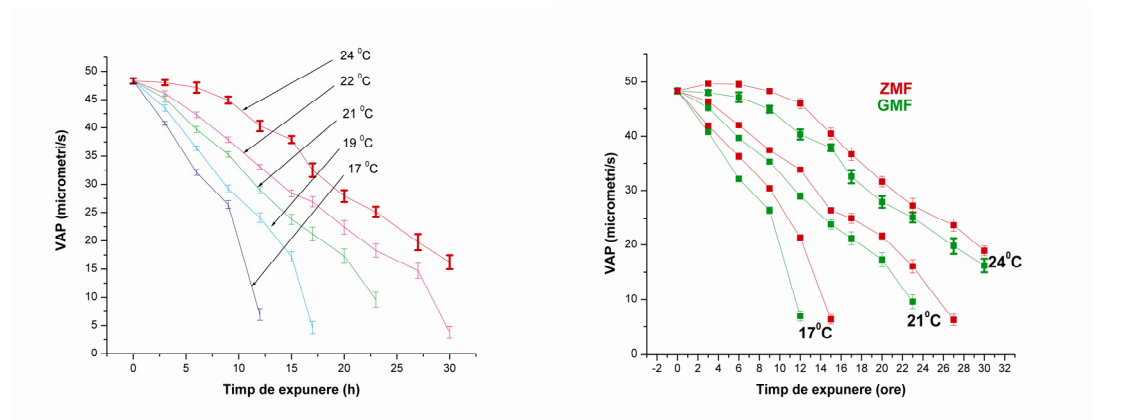


Fig.10 Variația VAP a unei probe de tip normozoospermie (72, 9, 19%) cu 32 mil/mL expusă în GMF (stânga). Variația VAP a unei probe de tip normozoospermie (72, 9, 19%) cu 32 mil/mL expusă în ZMF, și GMF ca și control, la trei temperaturi diferite. Eroarea de termostatare este de $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ (dreapta)

Spermatozoizii sunt celule a căror motilitate se activează la scurt timp după lichefierea lichidului seminal. Velocitatea de mișcare a acestor celule depinde de temperatura la care ele sunt expuse. La crioprezervare celulele sunt imobile, iar la temperaturi peste 43°C ele mor din cauza hipertermiei.

Pentru studiul in vitro am lucrat la temperatura camerei. Am făcut un set de 5 experimente pentru a determina influența temperaturii asupra vitezei în linie dreaptă (VAP) a spermatozoidelor expuși în GMF. Prezentăm VAP celulelor rapid progresive pentru cele 5 temperaturi (Fig.10). Proba a fost aleasă de la un pacient foarte fertil (72, 9, 19 %) 32 mil./ml. Se observă că la 17°C după aproximativ 13 ore practic toate celulele sunt imobile.

La 24 °C avem celule încet progresive chiar și după 30 ore. Când toate celulele sunt imobile proba nu mai este considerată viabilă [WHO, 2001].

Rata de descreștere a VAP la cele 5 temperaturi considerate este mai mare pentru temperaturi mai mici. Chiar și la o diferență de numai 2°C rata de descreștere medie a VAP diferă semnificativ. La proba expusă la 24 °C avem o rată de descreștere medie de 1.06μm/s/h în timp ce la 22 °C rata de descreștere medie este 1.48μm/s/h.

Prezentăm variația în timp a VAP a unei probe de tip normozoospermie (72, 9, 19 %) la expunerea în ZMF, respectiv GMF ca și control, termostatate la 3 temperaturi diferite (Fig.10). De menționat este că rata de descreștere a VAP medii este mult mai ridicată la temperaturi de expunere scăzute, iar pentru aceeași temperatură de expunere proba expusă în ZMF are o valoare semnificativ mai ridicată a VAP medii decât proba expusă în GMF (Fig.10). Deasemenea viabilitatea probelor depinde de temperatura de expunere, dar și de valoarea densității de flux magnetic.

Proba de la 24°C expusă în ZMF nu mai este viabilă după 49 ore, în timp ce proba expusă în GMF nu mai este viabilă după 46 ore. Proba de la 21°C expusă în ZMF nu mai este viabilă după 35 ore, în timp ce proba expusă în GMF nu mai este viabilă după 31 ore. Proba de la 17°C expusă în ZMF nu mai este viabilă după 19 ore, în timp ce proba expusă în GMF nu mai este viabilă după 15 ore.

Dacă analizăm graficele probelor prezentate (Fig.10) se constată că probele mai sunt viabile și atunci când teoretic valoarea medie a VAP este zero. Prin urmare există o perioadă în care spermatozoizii umani la o anumită temperatură de expunere nu mai sunt motil progresivi, dar ei au totuși un metabolism, deci consumă glucoză (și desigur și alți nutrienți). Din intersecția axei OX cu graficele prezentate rezultă perioada de timp în care spermatozoizii nu mai sunt motil progresivi, dar sunt viabili (Fig.10).

Această diferență dă o perioadă de timp aproximativă ce depinde de temperatura de expunere: 7 ore la 24 °C, 5 ore la 21 °C, și 3 ore la 17 °C. De menționat că crioprezervarea, înghețarea foarte rapidă, este cu totul un alt fenomen [Ishikawa et. al, 2007], iar efectele înregistrate și prezentate de noi nu se aplică la aceste temperaturi foarte joase.

INFLUENȚA ZMF ASUPRA VAP A CELULELOR HAPLOIDE MASCULINE UMANE

Categoria spermatozoizilor rapid progresivi este categoria responsabilă pentru calitatea spermei și estimările de fertilitate ale unui pacient. Acesta este motivul pentru care ne-am concentrat atenția mai ales pe această categorie de celule, însă am amintit și rezultatele

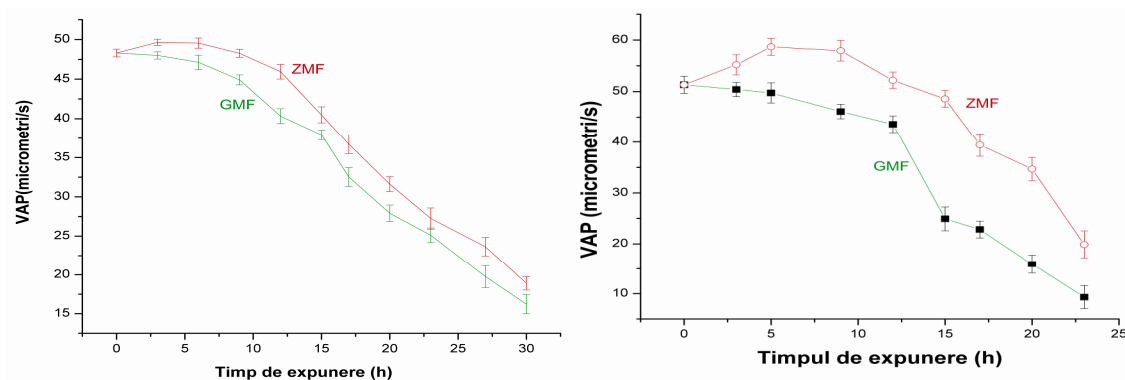


Fig.11 VAP medie al unei probe de tipul normozoospermie, foarte fertilă, (72, 0, 28%) cu 55mil/ml (stânga), respectiv (51, 17, 32) cu 62mil/ml (dreapta) la expunerea în ZMF, și GMF ca și control. Erorile standard de determinare sunt arătate pentru fiecare timp de expunere considerat

obținute la celelalte tipuri de celule. Toate probele considerate au fost studiate pentru determinarea VAP medie.

Velocitatea medie în linie dreaptă (VAP) este menținută mai mare la probele expuse în ZMF decât la probele expuse în GMF pe întreg timpul cât celulele sunt motile. Descreșterea VAP medie este întârziată în ZMF cu aproximativ 3.5 ore. Chiar și după 30 ore de expunere la această temperatură ($22 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$) VAP medie încă are valori semnificative.

După 30 ore de la lichefiere proba expusă în ZMF are valoarea VAP medie $19.1\mu\text{m/s}$ ($\pm 0.86\mu\text{m/s}$) în timp ce proba expusă în GMF are o valoare VAP medie $16.3\mu\text{m/s}$ ($\pm 1.23\mu\text{m/s}$) (Fig.11). În toate probele de tipul normozoospermie considerate în studiul nostru, la 22 ore după începerea expunerii, in vitro la 22°C ($\pm 0.3^{\circ}\text{C}$), celulele rapid progresive au fost practic inexistente în probele expuse în GMF, în timp ce 4% din totalul de celule au fost încă rapid progresive la probele expuse în ZMF.

Este de notat faptul că întodeauna valoarea VAP medie este mai ridicată la probele expuse în ZMF în comparație cu probele expuse în GMF semnificativ, iar rezultatele sunt similare cu mici diferențe specifice variației biologice a probelor [Truta Z et al., 2005].

Ambele grafice prezentate conțin valoarea medie VAP, și eroarea de determinare pentru fiecare moment în care s-au efectuat măsurătorile, arată același tip de evoluție relativă a probei expuse în ZMF, raportată la proba expusă în GMF (Fig.11).

Se observă că descreșterea naturală a VAP medie în timp este întârziată în timp cu aproximativ 3.5h la probele expuse în ZMF, în comparație cu probele expuse în GMF.

Sugerăm că creșterea concentrației de celule rapid progresive în primele ore după lichefiere, la celulele expuse în ZMF, se poate explica pe seama stimulării velocității celulelor, și ca urmare a trecerii unor celule de la celule lent progresive, la celule rapid progresive.

INFLUENȚA ZMF ASUPRA LINEARITĂȚII TRAIECTORIEI (LIN) CELULELOR HAPLOIDE MASCULINE UMANE

Un alt parametru important al fertilității este linearitatea traiectoriei spermatozoizilor. Teoretic la păstrarea celorlalți parametri de motilitate constanți, o linearitate mai bună va induce o fertilitate mai bună.

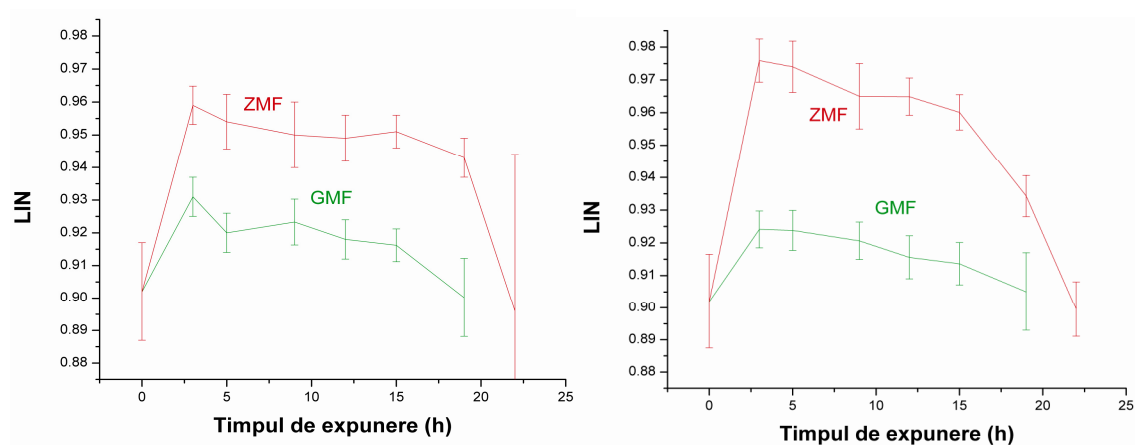


Fig.12 Evoluția în timp a linearității traiectoriei celulare la o probă sănătoasă (64, 6, 30%), respectiv (63, 14, 23%) (dreapta), expuse în GMF (verde), și ZMF (roșu)

Categoria de spermatozoizi care prezintă interes din punctul de vedere al estimărilor de fertilitate sunt spermatozoizii rapid progresivi. Prin urmare pentru măsurătorile de LIN a traiectoriilor celulelor am ales aleatoriu cel puțin 20 de spermatozoizi rapizi, pentru marcarea traiectoriilor, la fiecare moment în timp, la care s-au făcut măsurători.

Pentru conveniență am ales fotografierea secvențială cu o frecvență de 1Hz, și spermatozoizii care ies din câmpul vizual în mai puțin de 4s, nu au fost luați în calcul la determinarea valorii LIN a traiectoriilor celulelor. Toate determinările de LIN a traiectoriilor celulelor au fost făcute in vitro, la o temperatură a camerei de $22 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$. La expunerea aceleași probe sănătoase (64, 6, 30%) în ZMF și GMF ca și control parametrul de motilitate LIN a traiectoriilor celulelor crește la ambele probe în primele 3 ore. Oricum proba expusă în ZMF atinge o LIN a traiectoriilor celulelor mai bună (0.959) decât proba expusă în GMF (0.931) după 3 ore de expunere.

În cazul celei de-a doua probe prezentată (63, 14, 23%) după 3 ore proba expusă în ZMF atinge apogeul liniarității la o valoare a $LIN = 0.975$ în timp ce după același timp de expunere, în GMF valoarea maximă a LIN este doar de 0.924. Se observă că și la această probă (63, 14, 23%) LIN ia valori mai mari la proba expusă în ZMF în comparație cu proba expusă în GMF (Fig. 12).

Se observă că și la aceasta probă (63, 14, 23%) LIN ia valori mai mari la proba expusă în ZMF în comparație cu proba expusă în GMF pe tot timpul de expunere (Fig. 12).

INFLUENȚA ZMF ASUPRA AMPLITUDINII DE DEPLASARE LATERALĂ A CAPULUI (ALH) A CELULELOR HAPLOIDE MASCULINE UMANE

Un alt parametru important al motilității spermatozoizilor este deplasarea laterală a capului ALH (amplitude of lateral head displacement). Pentru a înțelege acest parametru trebuie să privim celula în mișcarea ei de înot ca un sistem format din cap, corp și coadă interconectate structural. În timp ce corpul înaintază, coada execută mișcări ondulatorii de lovire și revenire a lichidului în care înoată. Dacă aplicăm acestui sistem teorema de variație a impulsului pe direcția perpendiculară deplasării celulei, este clar că atunci când coada se va mișca de o parte a direcției de deplasare, o altă structură trebuie să echilibreze variația impulsului provocată de coadă, cu o variație a impulsului egală în modul și de sens contrar.

Prin urmare, deoarece deplasarea totală a centrului de greutate a celulei perpendicular pe direcția de mișcare este zero, capul și corpul celulei vor executa o mișcare de compensare a variației impulsului provocată de bătăile cozii.

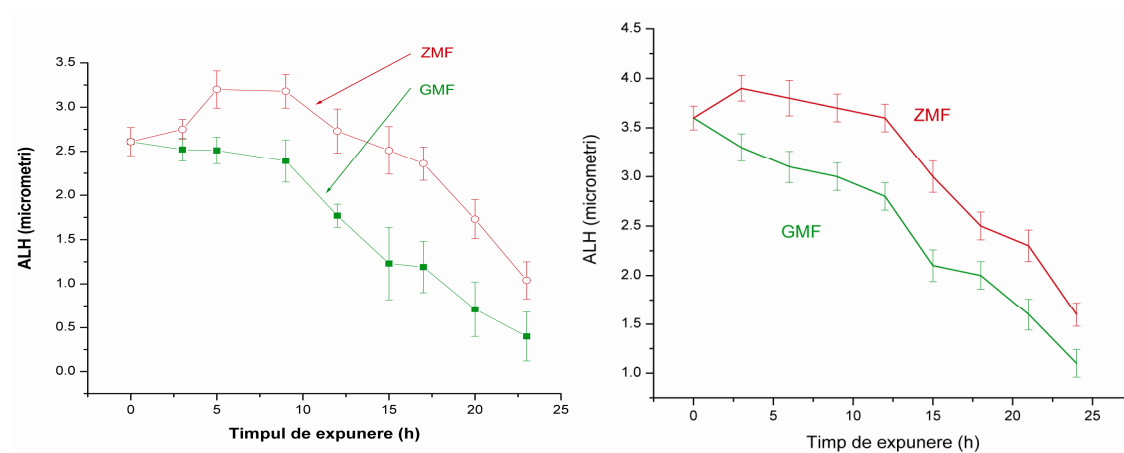


Fig.13 ALH pentru o probă sănătoasă (64, 6, 30%) (stânga), respectiv (63, 14, 23%) (dreapta), expusă în ZMF și GMF ca și control. Eroarea de determinare este arătată pentru fiecare set de măsurători

Ca rezultat capul spermatozoidului se va deplasa perpendicular pe direcția de înot a celulei de atâtea ori de câte va bate coada, compensând variația impulsului provocată de mișcarea cozii. Teoretic deoarece capul și corpul spermatozoidului sunt mai grele decât coada, și mișcarea de deplasare laterală a capului va fi mai mică decât cea a cozii. ALH a fost determinat pentru toate probele studiate. Pentru acest parametru am ales frecvența de fotografiere 25Hz. Această frecvență, în combinație cu derularea încetă a înregistrărilor înotului celulelor, permite observarea și studiul în detaliu a traiectoriei și deplasării laterale a capului. Se observă ca ALH are o valoare mai ridicată pe tot timpul expunerii la probele expuse în ZMF în comparație cu probele expuse în GMF (Fig.13). Același tip de variație în timp a valorii ALH, bazat pe timpii de expunere de referință, se regăsește la toate probele sănătoase considerate (tabel bazic neprezentat).

INFLUENȚA ZMF ASUPRA FRECVENȚEI DE BĂTAIE A COZII (BCF) A CELULELOR HAPLOIDE MASCULINE UMANE

Un alt parametru ce se ia în considerare la studiul parametrilor de motilitate ai fertilității masculine umane este frecvența bătailor cozii (BCF-beat cross frequency). Prezentăm ilustrativ evoluția în timp a BCF la expunerea în ZMF, respectiv GMF ca și control, a două probe sănătoase cu parametrii de numărare (64, 6, 30%) și (63,14,23%) (Fig.14). Din graficele prezentate (Fig.14) se constată că singurul parametru pentru care valoarea descrește la expunerea în ZMF în comparație cu GMF, este BCF. Toate probele studiate, de tipul normozoospermie, arată același tip de variație în timp, a parametrului de motilitate BCF.

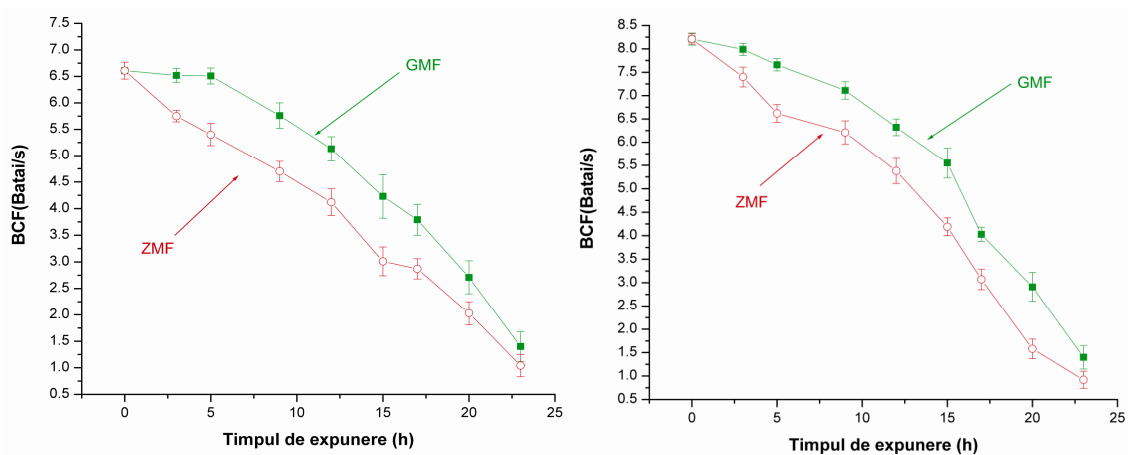


Fig.14 Variația în timp a BCF pentru o probă sănătoasă (64, 6, 30%)(stânga), respectiv (63, 14, 23%) (dreapta, expuse în ZMF și GMF ca și control. Eroarea de determinare este arătată pentru fiecare set de măsurători

CONSUMUL DE GLUCOZĂ AL CELULELOR EXPUSE ÎN ZMF ȘI GMF

Concentrația glucozei în probele de spermă umană expuse în ZMF, și GMF ca și control, au fost determinate folosind metoda proprie dezvoltată GUPV [Truța Z et al., 2010]. Am folosit ecuația [7] pentru fiecare set de 5 măsurători de absorbție la fiecare timp de referință considerat, pentru fiecare, și pentru toate probele de spermă analizate, după specificațiile metodei [Truța Z et al., 2010].

Prezentăm valorile absorbției relative Abs pentru picurile GUPV extrase conform metodei prezentate, determinate inițial, și după 72 ore expunere (final) în ZMF, și GMF ca și control (Tab.3).

Proba	GUPV GMF inițial (Abs)	GUPV GMF final (Abs)	GUPV ZMF final (Abs)
1	0.2596±0.0125	0.1493±0.0096	0.0715±0.0075
2	0.2396±0.0126	0.1540±0.0099	0.0591±0.0067
3	0.2877±0.0100	0.1727±0.0111	0.0824±0.0096
4	0.3083±0.0140	0.2380±0.0153	0.1229±0.0114
5	0.2791±0.0134	0.2178±0.0140	0.1104±0.0137
6	0.3214±0.0142	0.2225±0.0143	0.1104±0.0147
7	0.2379±0.0136	0.1447±0.0093	0.0466±0.0056
8	0.2602±0.0121	0.1649±0.0106	0.0778±0.0052
9	0.2791±0.0123	0.2053±0.0132	0.1151±0.0136
10	0.2717±0.0132	0.2038±0.0131	0.1136±0.0126
11	0.2494±0.0116	0.1587±0.0102	0.0715±0.0083
12	0.2425±0.0136	0.1867±0.0120	0.1058±0.0125
13	0.2957±0.0114	0.2053±0.0132	0.1151±0.0142
14	0.2820±0.0145	0.1649±0.0106	0.1167±0.0122
15	0.2722±0.0125	0.1493±0.0096	0.0638±0.0075
16	0.2728±0.0136	0.1384±0.0108	0.0357±0.0045
17	0.2928±0.0126	0.1509±0.0119	0.0466±0.0046
18	0.2631±0.0143	0.1742±0.0112	0.0840±0.0089
19	0.2528±0.0116	0.1571±0.0101	0.0762±0.0085
20	0.2396±0.0136	0.1913±0.0123	0.1073±0.0112
21	0.3003±0.0132	0.1696±0.0109	0.0591±0.0078
22	0.2694±0.0103	0.1649±0.0106	0.0793±0.0094
23	0.2265±0.0111	0.1384±0.0108	0.0529±0.0062
24	0.3283±0.0142	0.2318±0.0149	0.1182±0.0112

25	0.2533±0.0114	0.2007±0.0129	0.1058±0.0132
26	0.2591±0.0123	0.1524±0.0098	0.0466±0.0052
27	0.2671±0.0116	0.2085±0.0134	0.1182±0.0142
28	0.2379±0.0121	0.1509±0.0109	0.0575±0.0085
29	0.2774±0.0132	0.1898±0.0122	0.0933±0.0097
30	0.2722±0.0129	0.1664±0.0107	0.0637±0.0087

Tab.3 Valoarea absorbției relative Abs a GUVF inițială (coloana 2) determinată pentru toate probele considerate(#). Valoarea absorbției relative Abs a GUVF finală, determinată după 72 ore de expunere în ZMF(coloana 4), respectiv în GMF(coloana 3)

Din (Tab.3) rezultă concentrațiile de glucoză inițială, și finală în probele expuse în ZMF și GMF (Tab.4), conform ecuației [7].

Proba	Concentrația de glucoză inițială (mg/100mL)	Concentrația de glucoză finală GMF (mg/100mL)	Concentrația de glucoză finală ZMF(mg/100mL)
1	45.3±2.4	26.1±2.8	12.5±2
2	41.8±2.5	26.9±2.1	10.3±1.8
3	50.2±2	30.1±2.3	14.4±2.1
4	53.9±2.7	41.6±2.8	21.4±2.3
5	48.8±2.7	38±2.6	19.3±2.6
6	56.2±2.7	38.8±2.7	19.3±2.7
7	41.6±2.7	25.2±2.1	8.15±1.8
8	45.5±2.4	28.8±2.2	13.5±1.8
9	48.8±2.4	35.9±2.5	20.1±2.6
10	47.5±2.7	35.6±2.6	19.8±2.5
11	43.6±2.3	27.7±2.2	12.5±2.1
12	42.4±2.7	32.6±2.5	18.4±2.4
13	51.7±2.3	35.9±2.6	20.1±2.7
14	49.3±2.8	28.8±2.2	20.3±2.5
15	47.6±2.4	26.1±2.1	11.1±2
16	47.7±2.8	24.2±2.2	6.2±1.7
17	51.2±2.5	26.3±2.3	8.1±1.7
18	46±2.8	30.4±2.3	14.6±2.1
19	44.2±2.3	27.4±2.2	13.3±2.1
20	41.9±2.6	33.4±2.5	18.7±2.3
21	52.5±2.6	29.6±2.2	10.3±2

22	47.1±2.1	28.8±2.2	13.8±2.1
23	39.6±2.2	24.2±2.2	9.2±1.8
24	57.3±2.7	40.5±2.7	20.6±2.3
25	44.2±2.3	35±2.6	18.4±2.6
26	45.2±2.4	26.6±2.1	8.1±1.8
27	46.6±2.3	36.4±2.6	20.6±2.7
28	41.5±2.4	26.3±2.2	10.0±2.1
29	48.5±2.6	33.1±2.5	16.3±2.1
30	47.5±2.5	29.1±2.2	11.1±2.1

Tab.4 Concentrația de glucoză inițială (coloana 2), și a probelor expuse 72 ore în GMF (coloana 3), respectiv în ZMF (coloana 4)

Pe baza rezultatelor prezentate (Tab.4) se poate calcula consumul total de glucoză în ZMF, și GMF ca și control (Tab.5).

Proba	RP (%)	Consumul de glucoză totală în GMF (mg/100mL)	Consumul de glucoză totală în ZMF (mg/100mL)
1	52	19.1±5.2	32.7±4.4
2	57	14.8±4.6	31.4±4.3
3	59	20±4.3	35.7±4.1
4	70	12.2±5.5	32.4±5
5	66	10.7±5.3	29.4±5.3
6	71	17.3±5.4	36.8±5.4
7	60	16.3±4.8	33.4±4.5
8	53	16.6±4.6	31.9±4.2
9	57	12.8±4.9	28.6±5
10	56	11.8±5.3	27.6±5.2
11	57	15.8±4.5	31±4.4
12	50	9.7±5.2	23.9±5.1
13	59	15.7±4.9	31.5±5
14	58	20.4±5	28.9±5.3
15	64	21.4±4.5	36.4±4.4
16	69	23.4±5	41.4±4.5
17	67	24.8±4.8	43±4.2
18	63	15.5±5.1	31.3±4.9
19	54	16.7±4.5	30.8±4.4
20	51	8.4±5.1	23.1±4.9

21	69	22.8±4.8	42.1±4.6
22	62	18.2±4.3	33.2±4.2
23	51	15.3±4.4	30.3±4
24	72	16.7±5.4	36.6±5
25	60	16.7±4.9	25.7±4.9
26	61	18.5±4.5	37±4.2
27	54	10.1±4.9	25.9±5
28	59	15.1±4.6	31.4±4.5
29	63	15.3±5.1	32.1±4.7
30	64	18.3±4.7	36.3±4.6

Tab.5 Consumul total de glucoză după 72 ore expunere în ZMF (coloana 4), respectiv în GMF (coloana 3), pentru probele sănătoase cu concentrația de celule rapid progresive RP (coloana 2), pentru toate probele considerate

CORELAREA PARAMETRILOR DE STUDIU

Rezultatele prezentate sugerează o corelație între procentul de celule rapid progresive inițial RP, și concentrația de glucoză din probele de tipul normozoospermie (Tab.4, Tab.5). Pentru a analiza această corelație am folosit analiza matematică (OrigIn 6.1) și transformata Fourier (FFT). Rezultatele sunt prezentate sub forma corelației matematice (Fig.14), și sub forma corelării FFT, (Fig.14).

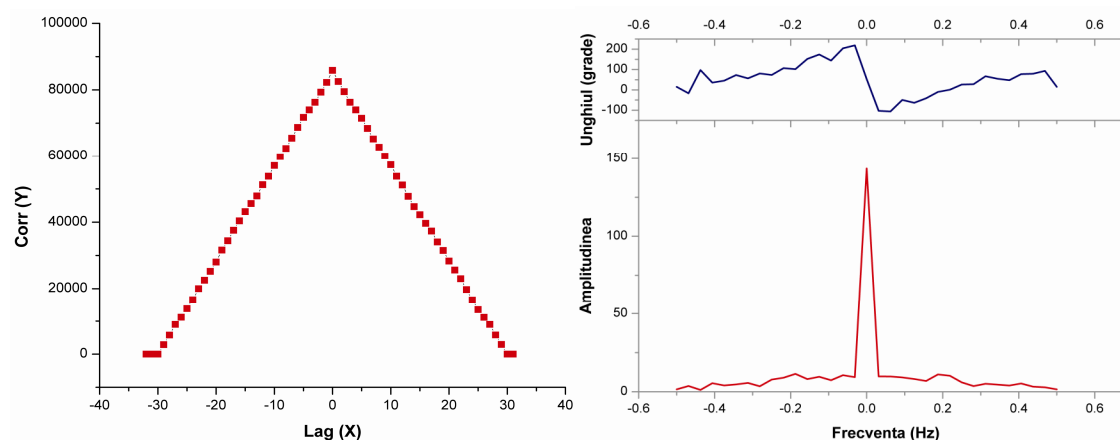


Fig. 15 Corelația dintre RP inițială și concentrația de glucoză inițială pentru toate probele sănătoase considerate (stânga). FFT arată o valoare absolută (amplitudine) semnificativă a corelației (dreapta).

Pentru probele sănătoase, probele cu concentrație inițială mai mare de glucoză au o concentrație mai mare de celule rapid progresive (Tab.4, Tab.5, Fig.15). Dacă folosim transformata Fourier (FFT) cu două coloane de valori, ce reprezintă concentrația inițială de glucoză, și concentrația de spermatozoizi rapid progresivi în probele sănătoase de spermă, amplitudinea de corelație are valoarea 143.42 (Fig.15). De asemenea concentrația medie finală de glucoză în probele sănătoase expuse în ZMF, și GMF ca și control poate fi calculată (Tab.4). Din rezultatele prezentate (Tab5) se poate calcula concentrația de glucoză medie în probele de spermă umană de tipul normozoospermie:

Concentrația medie inițială de glucoză = $41.17 \pm 4.38 \text{ mg/100mL}$ [8]

Concentrația medie finală de glucoză în ZMF = $14.73 \pm 4.74 \text{ mg/100mL}$ [9]

Concentrația medie finală de glucoză în GMF = $31.02 \pm 5.0 \text{ mg/100mL}$ [10]

Consumul de glucoză pentru fiecare probă în parte, arată că una și aceeași probă expusă în ZMF consumă semnificativ mai multă glucoză, decât expusă în GMF. Acest fapt se verifică pentru fiecare probă de spermă în parte, și pentru toate probele fără excepție (Tab.5). O altă corelare care prezintă interes este corelarea dintre RP inițială și consumul total de glucoză a probelor expuse în ZMF, și GMF ca și control.

Rezultatele arată o corelare bună între RP inițială a probelor sănătoase și consumul total de glucoză în GMF, și aproape dublă între RP inițială a probelor sănătoase și consumul total de glucoză în ZMF (Fig.16).

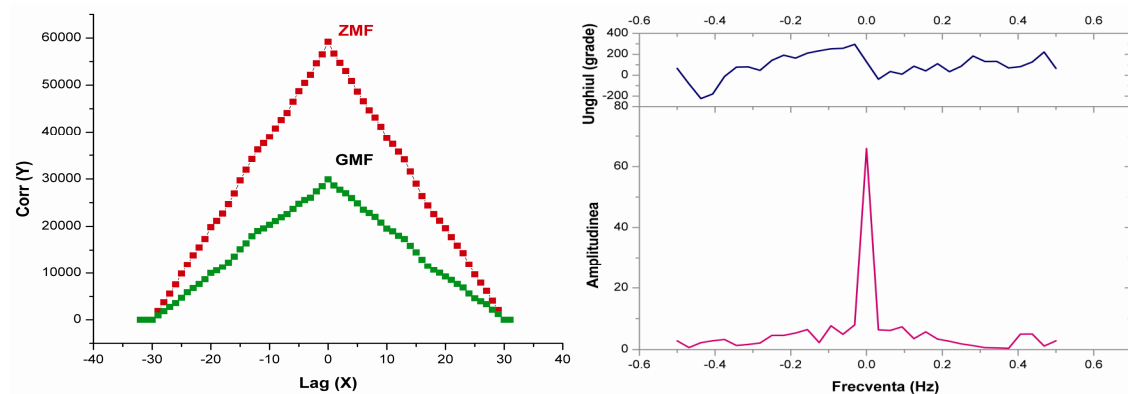
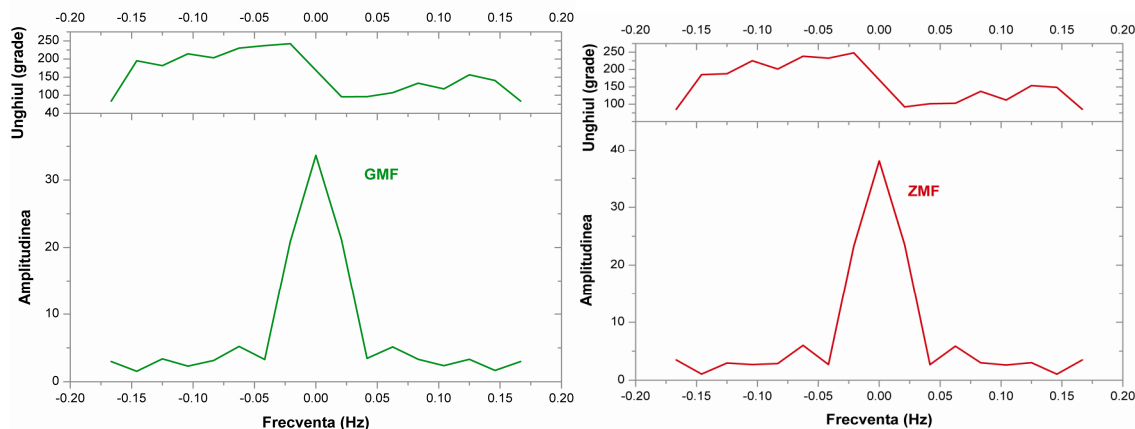


Fig. 16 Corelația dintre RP inițială și consumul de glucoză totală pentru probele sănătoase considerate expuse în ZMF și GMF ca și control. FFT arată o valoare absolută (amplitudine) corespunzătoare unei corelații bune



***Fig.17 Corelarea ALH cu VAP pentru o probă sănătoasă (63, 14, 23%) prin FFT
amplitudine, pentru proba expusă în GMF, respectiv aceeași probă expusă în ZMF***

De menționat este că corelarea dintre RP inițială a probelor sănătoase și consumul total de glucoză este bună numai la probele de tipul normozoospermie, unde majoritatea celulelor sunt rapid progresive.

Una dintre cele mai importante corelări pentru studiul nostru este cea dintre ALH și VAP a aceleași probe. În acest sens prezentăm corelarea menționată pentru aceeași probă expusă în GMF, respectiv în ZMF, pentru o probă de tipul normozoospermie (63, 14, 23%) (Fig.17). Corelarea între ALH și VAP a probei menționate expuse în GMF, dă o FFT Amplitudine de 34.02 (Fig.17). Corelarea între ALH și VAP a probei menționate expuse în ZMF, dă o FFT Amplitudine de 38.16 (Fig.17). Este de menționat că amplitudinea de corelare a transformatei Fourier pentru aceeași probă expusă în GMF, respectiv ZMF, între ALH și VAP este apropiată ca și valoare.

DISCUȚII DE SINTEZĂ

Radiațiile electromagnetice de radiofrecvență (100 kHz - 300 GHz) au influențe negative asupra celulelor de reproducere masculine, cât și asupra generării acestora (spermatogeneza). Câmpurile magnetice EMF - ELF de formă pătrată pulsativă stimulează motilitatea celulelor haploide masculine umane. Câmpurile magnetice produse de liniile de înaltă tensiune nu influențează semnificativ celulele haploide masculine umane, deși rapoartele arată că ele cresc riscul de cancer la sân, cât și riscul de a face leucemie. Rapoartele sunt inconsistente și raportează influențe nesemnificative. Motilitatea și viteza spermatozoizilor umani depind in vitro de temperatura la care se expun probele de

spermă (Fig.10). Motilitatea și viteza spermatozoizilor umani scade cu temperatura, la temperatura camerei.

Banda de absorbție UV a glucozei cu un pic la 213nm nu poate fi extrasă din spectrul UV-VIS al glucozei din cauza absorbției pronunțate UV a proteinelor în acest interval al lungimii de undă (Fig.9). Albumina are o absorbție UV pronunțată, dar ea nu influențează extracția picului UV-VIS al glucozei de la 267nm (Fig.6).

Metoda de determinare a consumului de glucoză GUVF, sau a concentrației de glucoză în probele de spermă umană prin analiză spectrofotometrică cantitativă, dă valori bune, conforme cu literatura, cu erori acceptabile (sub 4%) [Truța Z et al., 2010]. Măsurarea concentrației de glucoză în probele de spermă umană s-a făcut în ultimii 100 ani, dar rezultatele raportate sunt rare și diferă de la 39.50mg/100mL [Ighinaduwa P et al., 2007] până la 71mg/100mL [Montagnon D et al., 1982]. Alți autori raportează o concentrație medie a glucozei în probele de spermă umană 25.8mg/100mL [Tomaszewski L et al., 1992], sau chiar mai puțin, 18.3mg/100mL [Hirsch IH et al., 1991]. Un stimulant de lichid seminal a fost propus cu concentrația de glucoză de 102mg/100mL [Mukai C et al., 2005]. Cele mai noi rezultate raportate până acum arată o concentrație a glucozei în sperma umană sănătoasă de 47.17 ± 4.13 mg/100mL [Truța Z et al., 2010]. Am exclus din analiza comparativă rezultatele raportate înainte de 1980 ca nefiind de încredere.

Concentrația inițială a glucozei în probele de spermă și numărul total de celule în probele de spermă umană nu sunt corelate (Tab.2). Amintim că glucoza din lichidul seminal uman este produsul vezicii seminale, iar spermatozoizii sunt produși în testis, două locuri total diferite ale corpului uman.

Concentrația de celule rapid progresive, celule ce dau estimările de fertilitate masculină în probele de spermă umană, descrește în timp și ajunge să fie zero după aproximativ 30 ore, la temperatura camerei de $22 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ (Fig.9).

Parametrul de motilitate VAP crește pentru probele expuse în ZMF, în primele ore după lichefiere, în timp ce VAP descrește pentru probele expuse în GMF în primele ore după lichefiere la temperatura camerei $22 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ (Fig.11).

Parametrul de motilitate LIN crește mai mult pentru probele expuse în ZMF, în primele ore după lichefiere, în comparație cu LIN pentru probele expuse în GMF (Fig.12). Fiecare în parte, și toate probele de tipul normozoospermie au o liniaritate mai bună în ZMF în comparație cu expunerea în GMF.

Corelarea dintre ALH și VAP (Fig.13) pentru fiecare probă considerată expusă în ZMF și GMF (tabel neprezentat), arată că pentru a obține viteze mai mari spermatozoidul

trebuie să lovească mediul cu bățai ale cozii mai ample, și ca urmare ele vor fi mai rare, iar capul se va deplasa mai mult perpendicular pe direcția de mișcare.

Parametrul de motilitate BCF descrește mai pronunțat pentru probele expuse în ZMF, în primele ore după lichefiere, în comparație cu probele expuse în GMF (Fig.14).

Rezultatele arată că după 72 ore de expunere în ZMF consumul mediu de glucoză este de $26.97 \pm 4.9\text{mg}/100\text{mL}$ în timp ce după expunerea pe aceeași perioadă de timp în GMF consumul mediu de glucoză este de $10.15 \pm 4.1\text{mg}/100\text{mL}$ [9, 10].

Aceste rezultate au fost comparate cu rezultatele publicate [Barak Y et al., 1998, Mahaven MM et al., 1997, Williams C et al., 2001, Miki K et al., 2004, Truța Z et al., 2011] pentru a confirma importanța glucozei, ca și substrat bioenergetic major pentru motilitatea spermei.

După 5 ore de expunere în ZMF probele de spermă umană își măresc concentrația de celule RP în medie cu 10.23% (66.43% de la 60.26%, $P < 0.05$) în comparație cu o scădere a concentrației a celulelor RP cu 3.31% pentru probele de control expuse în GMF (58.26% de la 60.26%, $P < 0.05$) (Tab.6).

Scara de etalonare determinată de noi (Fig.8, Ecuația [7]) poate fi folosită pentru analiza spectrofotometrică cantitativă cu erori acceptabile (sub 0.0059 Abs, adică sub 0.6 mg/100 mL) la diluția de 1:5.

Sugerăm că la diluții mult mai mici decât cele în care am determinat scara de etalonare nu poate fi folosită, deoarece variația concentrației componentelor chimici nu este liniară cu intensitatea absorbției relative. Este cunoscut că intensitatea absorbției relative la probe nediluate, sau slab diluate, variază cu concentrația substratelor după o curbă de tip saturație, în care evident o fitare liniară nu poate fi folosită.

CONSIDERENTE DE ACTIVITATE GEOMAGNETICĂ

Deoarece în timpul experimentelor noastre indicele Ap a luat valori mai mici de 15 (nivelul de furtună magnetică minoră), experimentele au fost făcute în timpul unei activități geomagnetice liniștite (Fig.18).

Acest fapt arată că experimentele prezentate nu au fost influențate de furtuni magnetice. Intervalul de timp în care experimentele au fost efectuate este delimitat în graficul prezentat, între săgeți (Fig.18). Deasemenea toate celelalte tipuri de radiații electromagnetice uzuale EMF, ELF nu au fost ecranate, ele fiind aceleași la probele expuse în ZMF și cele expuse în GMF.

Am tras concluzia că efectele înregistrate în ZMF au fost datorate lipsei GMF, și nu a altor factori. Activitatea geomagnetică (GMA) măsoară fluctuațiile naturale ale câmpului magnetic terestru și este măsurată cu indicele Ap, și indicele K ale GMA.

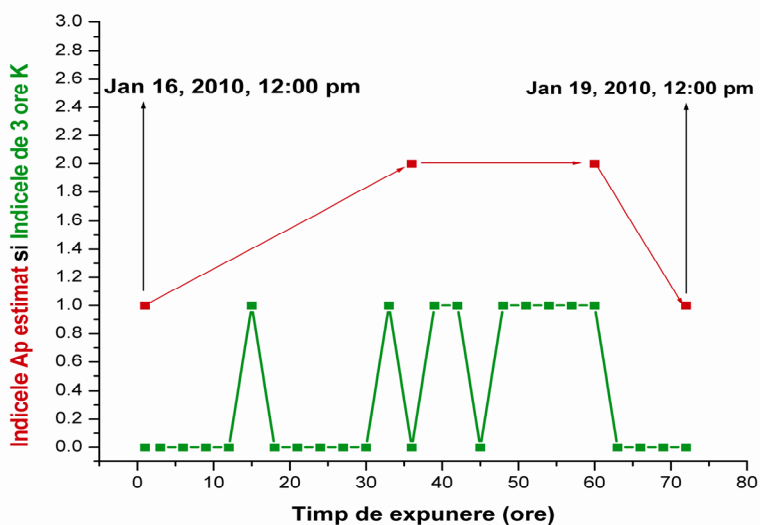


Fig.18 Activitatea geomagnetică în perioada în care s-au expus probele de spermă umană în ZMF și GMF

Acești indici au fost luați din rapoartele Centrului de Date Geofizice Naționale al USA [USAF Estimated Ap Index, 2010].

CONCLUZII

ZMF stimulează viteza VCL și VAP spermatozoizilor umani in vitro, în comparație cu GMF (Fig.11).

ZMF stimulează LIN spermatozoizilor umani in vitro, în comparație cu GMF (Fig.12)

ZMF stimulează ALH spermatozoizilor umani in vitro, în comparație cu GMF (Fig.13). La expunerea probelor de spermă umană de tipul normozoospermie în ZMF, ele își micșorează BCF în comparație cu expunerea în GMF (Fig.14).

Corelația dintre consumul de glucoză al probelor expuse în ZMF, și GMF cu proporția de celule RP inițială, sugerează că consumul necesar de glucoză al spermatozoizilor umani sănătoși este folosit în majoritate pentru motilitatea lor (Tab.5, Fig.16). Rezultate similare au fost raportate și pentru alte tipuri de mamifere [Mukai C et al., 2004].

Metoda dezvoltată de noi permite studiul compozițional nedistructiv din punct de vedere chimic al probelor de lichid seminal uman. Rezultatele noastre arată că determinarea concentrației glucozei în sperma umană, pe baza spectrofotometriei UV-VIS, este posibilă cu același grad de sensibilitate ca și al tehnologiilor actuale, și ea conferă o flexibilitate în plus domeniului de cercetare specific.

Concentrația de glucoză în lichidul seminal este un parametru bioenergetic important, și recomandăm metoda GUVF dezvoltată de noi, pentru studiile metabolismului spermatozoidului uman.

După 5 ore de expunere în ZMF motilitatea spermei umane de tip normozoospermie a fost semnificativ mărită (Fig.11, Fig.12). Aceste rezultate sugerează că o simplă expunere in vitro în ZMF poate mări estimările de fertilitate a spermei umane.

Sugerăm că efectul de stimulare a motilității spermatozoizilor umani ai ZMF, în comparație cu GMF, se datorează consumului de glucoză mărit în ZMF, în comparație cu GMF, care crește nivelul sintetizării de carburant biologic ATP. Creșterea nivelului de concentrație a ATP-ului în lichidul seminal stimulează semnificativ motilitatea spermatozoizilor umani.

Analiza de sinteză a rezultatelor obținute arată ca GMF induce dezordine semnificativă la nivel molecular în cazul celulelor haploide masculine umane, iar compensând acest câmp, obținând ZMF, putem minimaliza semnificativ acest efect inhibitor al GMF asupra parametrilor de motilitate ai fertilității umane masculine.

REFERINȚE

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P., Cilia and Flagella Are Motile Structures Built from Microtubules and Dyneins, Molecular motors, Molecular Biology of the Cell, (2002)
2. Asashima M, Shimada K, Pfeiffer CJ. Magnetic shielding induces early developmental abnormalities in the newt, *Cynops pyrrhogaster*. Bioelectromagnetics, 12(4): 215-224 (1991)
3. Barak Y., Goldman S., Gonen Y., Nevo Z., Bartoov B., Kogowski A., Does glucose affect fertilization, development and pregnancy rates of human in-vitro fertilized oocytes?, Hum. Reprod., 13, 4203-4211, (1998)

4. Cao W., Haig-Ladewig L., Gerton G. L., Moss Stuart B., Adenylate Kinases 1 and 2 Are Part of the Accessory Structures in the Mouse Sperm Flagellum, *Biol. Reprod.*,
5. Courtillot V, Le mouel JL. Time variations of the Earth magnetic field: From daily to secular. *Annual review of Earth and Planetary Science*, 16:435-439 (1988)
6. De Vita R, Cavalo D, Raganella L, Eleuteri P, Grollino MG, Calugi A. Effects of 50 Hz magnetic fields on mouse spermatogenesis monitored by flow cytometric Analysis. *Bioelectromagnetics* 16:330-334 (1995)
7. Du J., Tao J., Kleinhans F.W., Mazur P., Critser J.K. Water volume and osmotic behaviour of mouse spermatozoa determined by electron paramagnetic resonance. *Journal of Reproduction and Fertility* 101: 37-42 (1994)
8. Emura R, Ashida N, Higashi T, Takeuchi T. Orientation of bull sperms in static magnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 22(1): 60-65 (2001)
9. Fletcher DA si Theriot JA. An introduction to cell motility for the physical scientist. *Phys Biol.* 2004 Jun;1(1-2):T1-10 (2004)
10. Gailliot, M.T., Baumeister, R.F., DeWall, C.N., Maner, J.K., Plant, E.A., Tice, D.M., Brewer, L.E., & Schmeichel, B.J. "Self-Control relies on glucose as a limited energy source: Willpower is more than a metaphor." *Journal of Personality and Social Psychology* 92: 325-336 (2007)
11. Gajewski E, Steckler D, Goldberg R. "Thermodynamics of the hydrolysis of adenosine 5'-triphosphate to adenosine 5'-diphosphate". *J Biol Chem* 261 (27): 12733-7. PMID 3528161 (1986)
12. Ginsburg KA, Moghissi KS, Abel EL. Computer-assisted sperm analysis. Sampling errors and reproductibility, *Journal of Andrology*, (9), p.82-90, (1988)
13. Herndon J.M. "Nuclear georeactor origin of oceanic basalt $3\text{He}/4\text{He}$, evidence, and implications" *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (6): 3047-3050 (1991)
14. Hiroyuki T, Iijima S, Nakanishi Y, Kamiguchi Y, Asaka A. No induction of chromosomes aberrations in human spermatozoa exposed to extremely low frequency electromagnetic fields. *Mutation Research*, 414:31-35 (1998)

15. Hirsch IH, Jeyendran RS, Sendor J, Rosecrans RR, Staas WE. Biochemical analysis of electroejaculates in spinal cord injured men: comparison to normal ejaculates. *J. Urology*. 154: 73-76 (1991)
16. Ighinaduwa P, Ighinaduwa B, The Predictive Value of Glucose-fructose Ratio in Seminal Plasma, *World Applied Sciences Journal*, 2, 602- 605, (2007)
17. Iorio R, Scrimaglio R, Rantucci E, Delle Monache S, Di Gaetano A, Finetti N, Francavilla F, Suntucci R, Tettamanti E, Colonna R. 2007. A preliminary study of oscillating electromagnetic field effects on human spermatozoon motility. *Bioelectromagnetics* 28:72-75 (2007)
18. Ishikawa H. and Kaneko S. Human Sperm Cryopreservation —Theory and Clinical Application. *J.Mamm.Ova.Res.*, Vol. 24, 14-17, (2007)
19. Ishijima S., Digital image analysis of flagellar beating and microtubule sliding of activated and hiper activated sperm flagela, 10 th. International symposium, Madrid, 09-3, 43 (2006)
20. Jequier A.M., Crish J.P., Semen analysis: a practical guide, Blackwell Scientific Publications, Oxford, (1986)
21. Kirschner KN, Woods RJ "Solvent interactions determine carbohydrate conformation". *Proc. National Acad. Sci. USA*. 98 (19): 10541-10545 (2001)
22. Kowalczyk CI. Biological Effects of Exposure to Non-ionizing Electromagnetic Fields and Radiation. I. Static Electric and Magnetic Fields (NRPB-R238). *Natl Radiat Protec Board*, Chilton, (1991)
23. Kubota H, Ogiwara Y, Matsuzaki K, Photo-Induced Formation of Peroxide in Saccharides and Related Compounds, *Polymer Journal*, 8, 557-563, (1976)
24. Lodish, H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J. *Molecular Cell Biology*, 5th, New York: WH Freeman. (2004)
25. Mahaven M.M., Miller M.M., Moutos D.M., Absence of glucose decreases human fertilization and sperm movement characteristics in vitro, *Hum. Reprod.*, 12, 119-123, (1997)
26. Makler A. A new multiple exposure photography method for objective human spermatozoa motility determination. *Fertil. Steril.* 30:192–199 (1978)
27. Makler A, Tatcher M, Vilensky A, Brandes JM. Factors affecting sperm motility. III. Influence of visible light and other electromagnetic radiations on human sperm velocity and survival. *Fertility and Sterility* 33:439-444 (1980)

28. Makler A, Murrilo O, Huszar G, Tarlatzis B, DeCherney A, Naftolin F. Improved techniques for collecting motile spermatozoa from human semen. *International Journal of Andrology*. Vol. 7 (1) 61-70 (1984)
29. Miki K, Qu W, Goulding EH, Willis WD, Bunch DO, Strader LF, Perreault SD, Eddy EM, O'Brien DA. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16501-6 (2004)
30. Miller G. Exposure guidelines for magnetic fields. *Amer Indust Hygiene Assoc J* 48:957-968 (1987)
31. Montagnon D, Clavert A, Cranz C. Fructose, proteins and coagulation in human seminal plasma, *Andrologia*, 14, 434- 439, (1982)
32. Moulder JE, Foster KR. Biological effects of power-frequency fields as they relate to carcinogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 209:309-324 (1995)
33. Mukai C, and Okuno M. Glycolysis Plays a Major Role for ATP Supplementation in Mouse Sperm Flagellar Movement. *Biol. Reproduction* 71, Vol.2. pp 540-547 (2004)
34. Narra VR, Howell RW, Goddu SM, Rao DV. Effects of a 1.5-Tesla static magnetic field on spermatogenesis and embryogenesis in mice. *Invest Radiol*, 31(9): 586-590 (1996)
35. NIOSH Health Hazard Evaluation Report: Alumax of South Carolina. Cent Disease Control Prevention, NIOSH, (1994)
36. Owen D.H., Katz D.F., A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen stimulant. *Journal of Andrology*, Vol. 26 (4):459-469 (2005)
37. Ramadan L.A., Adel R.A. Abd-Allah, Hamdy A.A. Aly, Aisha A. Saad-El-Din, Testicular toxicity of magnetic field exposure and prophylactic role of coenzyme Q 10 and L-carnitine in mice. *Pharmacological research*, 46 (2002)
38. Romac P, Grubišić T, Čulić O, Cvitković P, Flogel M. Sperm motility and kinetics of dynein ATPase in astheno- and normozoospermic samples after stimulation with adenosine and its analogues. *Human Reproduction*, Vol. 9. No.8. pp 1474-1478 (1994)
39. Rossato M, La Sala G B, Balasini M, Taricco F, Galeazzi C, Ferlin A, Foresta C. 1999. Sperm treatment with extracellular ATP increases fertilization rates

- in in-vitro fertilization for male factor infertility. Human Reproduction 14, Vol.3. pp 694-697
40. Stuchly MA Human exposure to static and time-varying magnetic fields. Health Phys 51:215-225 (1986)
 41. Supino R, Bottone MG, Pellicciari C, Caserini C, Bottiroli G, Belleri M, Veicsteinas A. Sinusoidal 50 Hz magnetic fields do not affect structural morphology and proliferation of human cells in vitro., Histol Histopathol 16: 719-26 (2001)
 42. Tablado L, Francisco Pérez-Sánchez F, Núñez J, Núñez M, Soler C. Effects of exposure to static magnetic fields on the morphology and morphometry of mouse epididymal sperm. Bioelectromagnetics. Vol. 19 (6) 377–383 (1998)
 43. Takeuchi T, Nakaoka Y, Emura R, Higashi T. Diamagnetic Orientation of Bull Sperms and Related Materials in Static Magnetic Fields. Journal of the Physical Society of Japan 71, Vol.1. pp 362-368 (2002)
 44. Tomaszewski L, Konarska L, Janczewski Z, Skarzynska E, Lebiada K, Hryckiewicz L. Fructosamine in human and bovine semen, Life Sci., 50 (3), 181, (1992)
 45. Truța Z., Neamțu Silvia, Morariu V. Vasile, The influence of zero magnetic field on in vitro human spermatozoa cells behavior, Advanced biomaterials and biophysical techniques, may 26-28,2005, 8th National Biophysics Conference (2005)
 46. Truța Z., Neamțu Silvia, Morariu V. Vasile, Spermatozoa aging is slowed down in ZMF, Isotopic and molecular processes, Fourth PIM Conference, Cluj-Napoca, sept.22-24,(2005)
 47. Truța Z, Neamțu S, Morariu VV. Zero magnetic field influence on in vitro human spermatozoa cells behavior. Rom.J.Biophysics 15:73-77 (2005)
 48. Truța Z, Lerințiu S, Gârlovanu M, Morariu VV. Zero magnetic field influence on male reproductive cells progressive motility distribution. Sudia Universitatis Babes-Bolyai. Physica LI 1:39-43 (2006)
 49. Truța Z., Gârlovanu Marinela, Lerințiu Stela, Micu R. A new method for human semen glucose concentration evaluation, Romanian Biotechnological Letters, Vol.15 (6) 5764-5772 (2010) or on line at:<http://www.rombio.eu/rbl6vol15/cuprins.html>

50. Truța Z., Truța M., Micu R. Zero magnetic field influence on human spermatozoa glucose consumption, Accepted for publication by Roumanian Biotechnology Letters, Vol.16 (5) article nr.313 (2011)
51. USAF Estimated Ap index available from:
<http://sec.noaa.gov/Data/index.html#indices>
52. Wenlei C. Adenylate Kinases 1 and 2 Are Part of the Accessory Structures in the Mouse Sperm Flagellum, Biol. Reprod., Jun 21; p.1679-1685, (2006)
53. Williams A.C., Ford W. C., The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa, J. Androl., 22, 680-695, (2001)
54. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interactions. 3rd ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 1999. Biology of Reproduction 65, 1224-1231 (2001)
55. WHO. Electromagnetic fields and public health (2006)
56. Yang C, Owen HA, Yang P. Dimeric heat shock protein 40 binds radial spokes for generating coupled power strokes and recovery strokes of 9 + 2 flagella. The Journal of Cell Biology, Vol. 180, No. 2, 403-415 (2008)
57. Ying J, Grishaev A, Latham MP, Pardi A, Bax A, Glover PM, Bowtell R. Magnetic field induced residual dipolar couplings of imino groups in nucleic acids from measurements at a single magnetic field. J Biomol NMR 39(2):91-6 (2007)