

ВПЛИВ РІЗНИХ КРІОПРОТЕКТОРІВ ТА ЇХ СУМІШЕЙ НА МОРФОКІНЕТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ СПЕРМІЇВ ЛЮДИНИ

**В.І.Грищенко, Н.Н.Чуб, В.Л. Родіонова, Т.П.Лінник, М.Й.Крамар, Г.О.Гапон,
П.Тодоров**

Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, м.Харків

Інститут біології і імунології репродукції, м. Софія, Болгарія.

Була вивчена залежність загальних характеристик сперми людини від розчинів кріопротекторів та багатокомпонентних сумішей, часу експозиції з ними, їх рН та осмолярності. Результати проведених досліджень дозволили оцінити цитотоксичну роль ряду кріопротекторів і їх сумішей на спермії людини, виявити стимулюючий ефект поліетиленоксидів, незалежно від молекулярної маси, на рухливість гамет.

Ключові слова: спермії людини, кріопротектори, багатокомпонентні суміші.

Пошук ефективних кріозахисних середовищ (КС) є одним з актуальних питань кріобіології. Перспектива клінічного використання кріоконсервованого біологічного матеріалу передбачає глибоке всебічне вивчення можливої побічної дії кріопротекторів або їх багатокомпонентних сумішей. Особливу увагу було звернено на вивчення цитотоксичної дії КС у зв'язку зі застосуванням методу вітрифікації для різних біологічних об'єктів, що вимагають високих концентрацій кріопротекторів.

У даний час увага кріобіологів звернена на застосування середовищ, що містять кріопротектори ендо- і екзоцелюлярної дії. Як екзоцелюлярні кріопротектори найбільш часто застосовують високомолекулярні речовини – ПВП, поліетиленоксиди (ПЕО), диметилацетамід (ДМАЦ), декстрини, тригалоаза та ін. В останній час поширюються дослідження впливу сумішей кріопротекторів на різні біоб'єкти. Було встановлено, що перспективним направленням у розробці методів кріоконсервування кісткового мозку і клітин кордової крові є сполучення інтрацелюлярного розчину ДМСО і екстрацелюлярного розчину – гідроксилкрохмалю, а також для стовбурових клітин – 5% ДМСО і ПЕО 8000 або сахарози [1]. Багатокомпонентне середовище (ГЛЖ), що складається: лактоза – 63 мл 11%-го розчину; жовток курячого яйця - 30 мл; дистильована вода - 100 мл, гліцерин – 9 г, ефективно використовують для кріоконсервування спермій людини та бугаїв [2, 4]. Природа компонентів яєчного жовтка, широко досліджувалась при кріоконсервуванні сперматозоїдів бугаїв [3- 4]. Відомо, що у водно-сольових середовищах ліпоїдні компоненти курячого жовтка взаємодіють із ліпофільними ділянками цитоплазматичної мембрани, утворюють додаткові структури, що ізолюють ці ділянки від навколишнього середовища та збільшують їх стійкість до шкідливих впливів різного характеру: зокрема, осмотичного і механічного [5-6]. Однак у деяких випадках при культивуванні ооцитів і зигот наявність жовтка в КС досить несприятливо позначається на розвитку ембріонів *in vitro*. Відмивання КС, що містять жовток, особливо при олігоастенозооспермії може призвести до морфофункціональних ушкоджень спермій і зниження їх фертильності. Таким чином, застосування КС, які в подальшому не треба видаляти з клітинної суспензії, припускає використання багатокомпонентних середовищ, що складаються з різних за хімічним складом, фізико-хімічним

властивостям і впливом на біологічний об'єкт кріопротекторів. Такий підхід дає змогу знизити концентрацію цитотоксичних кріопротекторів, не знижуючи їхньої ефективності при кооперативному впливові на клітини, і, зокрема, на спермії людини і тварин.

У зв'язку з цим, метою даного дослідження було вивчення впливу розчинів кріопротекторів ендо- і екзоцелюлярної дії і їх багатокомпонентних сумішей на рухливість і життєздатність спермій людини.

Матеріали та методи досліджень. Матеріалом дослідження служили еякуляти, отримані від 96 здорових чоловіків у віці від 20 до 40 років після 3-4 днів статевої абстиненції. Про збереження спермій судили за відновленням рухливості і життєздатності гамет. Усі параметри спермій визначали в нативному еякуляті і після еквілібрації з КС. Еякуляти поміщали в термостат (37 °С) до повного розрідження. Концентрацію і рухливість спермій підраховували в камері Makler (Ізраїль) на світловому мікроскопі PZO (Польща) зі фазово-контрастною оптикою (x240), відповідно до рекомендацій ВООЗ [7]. В експериментах враховували фракції сперматозоїдів зі швидким (група «а») і повільним (група «в») поступально-прямолінійним рухом. Вміст життєздатних спермій визначали за допомогою суправітального барвника еозин-нігрозину [8]. Було досліджено 9 кріопротекторів різних класів і 13 їхніх композицій. (табл.). Розбавляли кріопротектори на середовищі Ерла (Serva, Німеччина) або розчині Хенкса від 3 % до 20% концентрації. Охолоджені кріопротектори і кріозахисні середовища повільно додавали в еякулят (1:1) і оцінювали рухливість спермій після 15, 30 і 60 хв інкубації з ними при температурі 35-37°С. Значення рН еякулатів і КС вимірювали на АТ-3-іонометрі (Німеччина). Осмолярність КС визначали за допомогою осмометра ОМК-Ц-01 (Україна).

Для статистичного опрацювання отриманих результатів використовували критерій Ст'юдента-Фішера з програмним забезпеченням Excel.

Результати досліджень. На даному етапі досліджень експерименти планували таким чином, щоб порівняти уже відомі й апробовані варіанти КС, що незначно впливають на гамети, з кріопротекторами або їх композиціями, раніше не досліджених на даному об'єкті. На підставі отриманих експериментальних даних встановлено, що після розрідження сперми концентрація спермій у ній становила $63,4 \pm 11,2$ млн./мл, кількість рухливих клітин (група а+в) – $49,3 \pm 7,3$ %, кількість життєздатних - $74,3 \pm 6,1$ %. Після додавання кріопротекторів і їх сумішей концентрація спермій у суспензії становила від 21 до 58 млн./мл (табл.).

Раніше було показано [8-9], що 30-хвилинна експозиція спермій зі кріозахисним середовищем, що містить гліцерин (ГЛ), є оптимальною при кріоконсервуванні спермій людини. При дослідженні впливу ГЛЖ на збереження спермій людини також була обрана 30-хв. експозиція з КС [2], тому у даному дослідженні був обраний режим повільного введення по краплях охолоджених КС в еякулят, при постійному перемішуванні суспензії клітин. Однак було виявлено, що кількість спермій зі швидким прямолінійним рухом і життєздатність гамет зберігалася навіть після 60 хв. інкубації з ПЕО м.м.400, 1500, 2000, 3000 (рис.1)

Порівняльна оцінка кінезисграм спермій із середовищем, до складу якого входить 10% ГЛ, показала достовірне зниження кількості клітин групи «а», про що свідчать і раніше отримані дані [11]. Гліцерин широко використовується для кріоконсервування сперми людини в різних країнах світу. Як правило, для низькотемпературного збереження сперми людини застосовують фірмові

**Залежність загальних характеристик сперми людини від розчинів
кріопротекторів та багатокомпонентних сумішей, їх осмолярності і рН**

Кріопротектори та багатокомпонентні суміші	Концентрація млн./мл	Рухливість "а" (%)	Рухливість "в" (%)	Осмолярність (мОсм)	рН
Натив	63,4±11,2	22	24,9	337	7,0-7,4
Средовище Ерла (Serva)	34,6±3,1	21	25,8	295	7,4
ГЛЖ	39,5±3,7	26,1	30,2	1100	7,4
ГЛ 10%	38,3±3,5	15 ^a	26,6	782	7,79
ГЛ 20%	42±4,1	10 ^a	31	1606	7,22
ПВП (12000) 10 %	55,6±5,3	11,6	40	304	7,47
ПВП (24000) 10 %	58±5,6	9,6 ^a	38,3	302	7,64
ГЛ 5% +ПВП (12000)1%	21,5±2,0	19 ^a	24,6	463	8,26
ГЛ 10% +ПВП (12000)1%	30,4±2,9	19,1 ^a	24,8	837	8,61
ГЛ 5% +ПВП 1% (24000)	21±2,0	20,4	24,9	425	9,00
ГЛ 10% +ПВП 1% (24000)	33,1±3,1	21,5	25,9	927	8,75
ГЛ5%+1,2-ПД 5%	32,3±3,0	21,6	25	455	7,6
1,2-ПД 2%	40±3,9	21,6	26	290	7,2
1,2-ПД 10%	39,6±3,7	14 ^a	27,4	957	7,54
1,2-ПД 20%	51,3±4,9	12,3 ^a	38	1750	7,37
1,2-ПД-10%+ ДМФА10%	33,6±3,2	21,1	18,2 ^a	1049	8,16
ДМФА 10%	36,3±3,3	22,6	19,2 ^a	891	7,56
ДМФА 4 %+ ЕГ 4 %	35,2±3,1	20	20,8 ^a	1375	8,39
ЕГ 10%	37,3±3,5	8 ^a	16,6 ^a	1185	8,2
ЕГ(3,5%) +1,2-ПД(3,5%) +ДМФА (3,5%) (глюкоза)	37,7±3,8	15,6 ^a	21,3 ^a	1589	8,436
ЕГ(3,5%) +1,2-ПД(3,5%) +ДМФА (3,5%) (фруктоза)	41,6±4,0	7,6 ^a	19,8 ^a	1045	5,0-5,2 ^a
ПЕО 400 5%	38±3,4	26	30	228	8,16
ПЕО 400 10%	32±2,9	24	26	305	8,29
ПЕО 1500 5%	35±3,2	24	30	222	8,14
ПЕО 1500 10%	35±3,4	25	29	258	8,24
ПЕО 2000 5%	40±3,8	27	30	174	8,05
ПЕО 2000 10%	40±4,1	24	30	219	8,14
ПЕО 3000 5%	42±3,9	27	30	165	8,76
ПЕО 3000 10%	37±3,4	27	29	207	8,64
ПЕО 2000 1 %+ДМСО 5%	35,9±3,2	22,2	24,8	1401	8,2
ПЕО 3000 1 %+ДМСО 5%	35±3,3	3,6 ^a	9,6 ^a	1120	8,22
Діметилсид 5%	33±3,0	22	24,7	576	7,12
Діметилсид 10%	29±2,7	19 ^a	21,2 ^a	883	7,45
ОАЦ (п=1) 5%	30±3,2	8 ^a	10 ^a	436	7,13
ОАЦ (п=1) 10%	21±1,9	5 ^a	9 ^a	670	7,45

Примітка. ^a – різниця достовірна по відношенню до показників еякуляту з ГЛЖ, $p < 0,05$.

середовища, що містять ГЛ від 7 до 15% з додаванням сироваткового альбуміну людини.

Було показано, що ГЛ негативно впливав на клітини при введенні його в суспензію у високих концентраціях – 20 % (рис.2) і більше, що підтверджено й іншими дослідниками [13-14]. При порівнянні результатів цитотоксичної дії кріопротекторів було виявлено, що спермії з 5 і 10% розчинами діметилсиду, 1,2-ПД і ПЕО (400, 1500, 2000, 3000) зберігають кінетичні характеристики на рівні контролю, а саме, ГЛЖ.

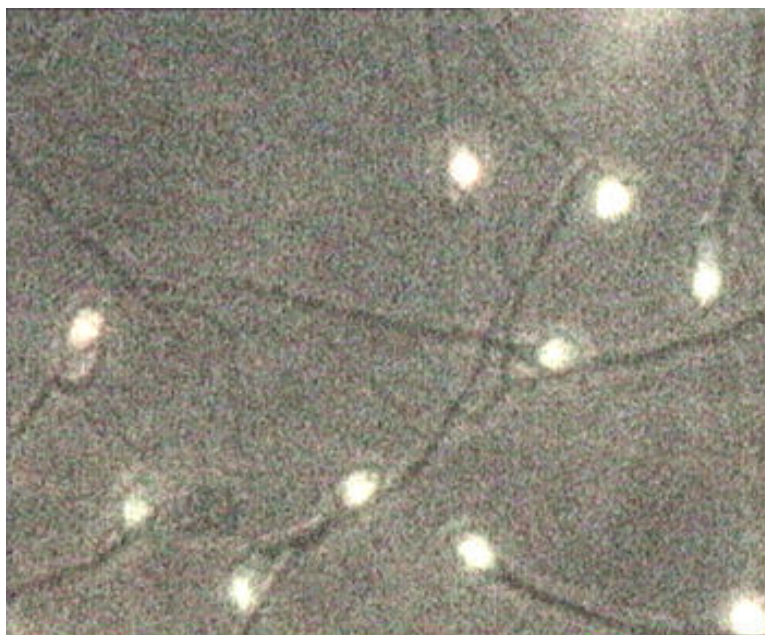


Рис.1. Життєздатність спермійв людини після 60 хв інкубації з поліетиленоксидом м.м.1500 (x1000).

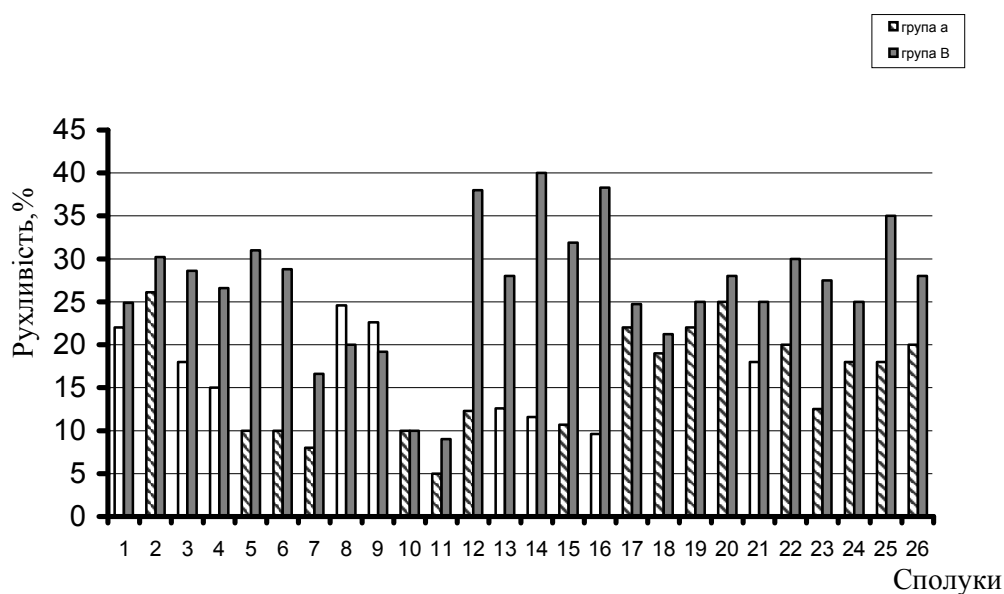


Рис.2. Вплив кріопротекторів на рухливість спермійв людини:

1-Натив; 2-ГЛЖ; 3-Гліцерин 5%; 4-Гліцерин 10%; 5- Гліцерин 20%; 6-ЭГ 5%; 7-ЭГ 10%; 8-ДМФА 5%; 9-ДМФА10%; 10-ОАЦ (п=1) 5%; 11-ОАЦ (п=1) 10%; 12-1,2ПД 20%; 13-ПВП (12000) 5 %; 14-ПВП (12000) 10 %; 15-ПВП (24000) 5 %; 16-ПВП (24000) 10 %; 17-Димексид 5%; 18-Димексид 10%; 19-ПЄО 400 5%; 20-ПЄО 400 10%; 21-ПЄО1500 5%; 22-ПЄО1500 10%; 23-ПЄО 2000 5%; 24-ПЄО 2000 10%; 25-ПЄО 3000 5%; 26-ПЄО 3000 10%.

Найбільшу цитотоксичну дію після 30 хв експозиції надавали ЕГ, ОАЦ і ПВП 24000 у 5 і 10% концентраціях, на що вказувало різке зниження мотильності спермій. Можливо, зниження концентрації даних речовин не буде впливати на кінетичні характеристики спермій, що є метою наших подальших досліджень.

При спільній дії 5 або 10% ГЛ з 1% ПВП рухливість спермій групи «а» була достовірно вища ($P < 0,05$) по відношенню до 10% «чистих» ГЛ і ПВП, однак нижча, ніж при впливі ГЛЖ (рис.3). ПВП (12000 и 24000) 5 і 10% знижував рухливість спермій, незалежно від молекулярної маси, що, мабуть, пов'язане, насамперед, з наявністю низькомолекулярних домішок. Вибір як криозахисного агента ПВП був обумовлений позитивними результатами, отриманими при криоконсервуванні деяких видів клітин: лімфоцитів периферичної крові, клітин кісткового мозку експериментальних тварин [14,16]. Присутність даної полімерної речовини в КС сприяє стійкому стану мембрани клітини, що запобігає елімінації вмісту клітини через плазматичну мембрану навіть в умовах осмотичної напруги. У зв'язку з чим, очевидно, цей полімер використовують для імобілізації спермій при ІКСІ.

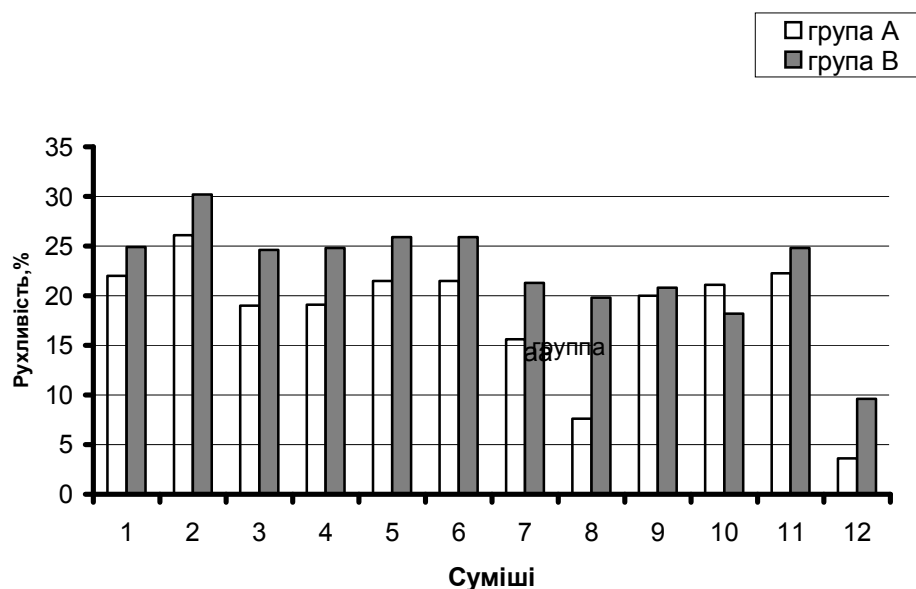


Рис. 3. Вплив суміші криопротекторів на рухливість спермій людини:

1-Натив; 2-ГЛЖ; 3-ГЛ 5% +ПВП (12000)1%; 4-ГЛ 10% +ПВП (12000)1%;
5-ГЛ 10%+ПВП 1% (24000); 6-ГЛ 10% +ПВП 1% (24000); 7.ЕГ+1,2ПД+ДМФА(глюкоза); 8.ЕГ+1,2ПД+ДМФА(фруктоза); 9.ДМФА +
ЕГ; 10.ДМФА+1,2ПД-10%; 11.ПЕО 2000 + ДМСО; 12.ПЕО 3000 + ДМСО.

Сполучення 5% ГЛ з 5% 1,2-ПД підвищувало кінетичні характеристики спермій у порівнянні з «чистим» 5 і 10 % 1,2-ПД і 10% ГЛ (див. табл.). При оцінці багатокомпонентних середовищ було відзначено, що найнижчі показники рухливості були отримані при використанні середовища 7 і 8 (див. рис.3), які містять по 3 криопротектори.

До нині у криобіології не знайдена пряма кореляція між фізико-хімічними показниками криопротекторів і їхньою криозахисною ефективністю. Разом з тим, відомо, що пошук залежності між структурою криопротектора і його криозахисними властивостями є найбільш перспективним підходом до

розшифрування механізмів кріозахисту [16]. Можливість математичного прогнозування нових кріопротекторів за допомогою рівнянь доведена в експериментальних роботах [17] на сполуках ряду амінів, що відкриває широкі можливості для підбору КС різних класів.

У даному дослідженні також була вивчена роль рН і осмолярності досліджуваних середовищ при різних концентраціях кріопротекторів на збереження спермій людини, зміна яких на етапах низькотемпературного консервування може призвести до неузгодженості найважливіших біохімічних процесів у клітині [18-19]. Так, відомо, що для міграції і життєздатності спермій людини оптимум значень рН становить 7,0-8,5.

Як видно з даних, представлених у таблиці, значення рН розчинів кріопротекторів і їх сумішей знаходилися у фізіологічному для сперми людини інтервалі – 7,2-8,6. Виключення становило середовище 21, значення рН 5,0-5,2; однак, його успішно використовують при кріоконсервуванні сперми півнів [10]. Відомо, що кисле середовище погіршує пенетраційну здатність спермій у цервікальному слизу, тому що знижується кількість клітин, що несуть негативний електричний заряд, унаслідок чого відбувається аглютинація клітин і їхня повна або часткова іммобілізація. Лужне середовище сприяє рухові гамет, однак, $\text{pH} > 8,5$ може також знижувати їхню рухливість і фертильність. У нашому дослідженні зміна рН у лужну сторону не впливала на кінетичні показники сперми. Величина осмотичного тиску є важливим параметром для регулювання складу розріджувачів і КС із метою тривалого збереження спермій [19]. При оцінці осмолярності різних середовищ спостерігали значний розкид значень від 420 до 1580 (див.табл.). Раніше було показано [20], що через 4 години інкубації кількість рухливих спермій становила 75 % у ізоосмолярній КС і 78 % - у КС із незначно підвищеною осмолярністю. При еквілібрації клітин в КС із гіперосмолярністю вже через 30 хв спостерігали виражене зниження рухливості - вона зберігалася лише в одиничних гаметах. Однак є дані про те, що осмолярність розчинів значно менше впливає на збереження спермій людини і тварин, ніж показники рН розчинів [2,21], що можна пояснити дією сполук, які входять до їх складу.

Таким чином, маючи різну проникність через мембрани клітин, композиції кріопротекторів можуть бути перспективними для заморожування сперми людини, і в даний час продовжуються дослідження з підбору ефективних не цитотоксичних сумішей кріопротекторів і способів їхнього введення в біооб'єкт.

Висновки:

1. Результати проведених досліджень дають змогу виявити стимулюючий ефект на рухливість спермій людини поліетиленоксидів, незалежно від молекулярної маси сполуки.
2. Були визначені кріопротектори і їхні композиції, що негативно впливали на чоловічі статеві клітини.

Бібліографічний список

1. Петренко Ю.О. Кріоконсервування клітин ембріональної печінки людини у багатокомпонентних кріозахисних середовищах: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.19 / ІПКіК НАНУ. - Харків, 2006. - 19 с.
2. Родіонова В.Л. Ферментативна активність і морфокінетичні властивості спермій людини до і після низькотемпературного консервування: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.35 / ІПКіК НАНУ.- Харків, 2005.-19 с.

3. Biaby G., Ludwick T.M., Hess E.A., Ely F. The influence of lipoprotein on the freezing of bovine spermatozoa.//J. Dairy Sci., 1957.- 40, № 12.-P. 1189-1192.
4. Осташко Ф.И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. – К.: Урожай. – 1978. – 225 с.
5. Осташко Ф.И. Разработка вопросов теории и практики глубокого охлаждения и длительного хранения спермы производителей: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Харьков. – 1968.-17с.
6. Bielfeld P., Jeyendren R.S., Holmgren W.J., Zaneveld L.J.D. Effect of egg yolk medium on the acrosome reaction of human spermatozoa // J. Androl. – 1990. – V. 11. – P. 260-269.
7. World Health Organization. Laboratory manual for examination of human semen and semen cervical mucus interaction //Cambridge: The Press of the University of Cambridge-1997.-22 p.
8. Паращук Ю.С., Скидан Н.П. Влияние криоконсервирования на спермии человека в норме и при патологии // Криобиология. - 1987. - №3. -С.22- 25.
9. Скидан Н.П. Влияние условий криоконсервирования на морфофункциональные свойства спермиев человека при патоспермии // Автореф дисс. ...канд. биол. наук: 03.00.22 .-Харьков, 1988.-19 с.
10. Линник Т.П., Бизикина О.В. Криоконсервирование спермы петухов. II. Криозащитная активность диолов и амидов // Пробл. криобиологии. – 2001. - № 4. – С.43-51.
11. Паращук Ю.С., Шраго М.И., Калугин Ю.В. и др. Сравнительная оценка цитотоксичности и криозащитной активности глицерина и его алкиловых эфиров при замораживании спермиев человека// Криобиология. - 1989.-№1.- С.40-43.
12. Critser J.K., Huse-Benda A.R., Aaker D.V., Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effects of cryoprotectants on motility // Fertil. Steril. – 1988. – V. 50.- P. 314-320.
13. Graham K., Hammerstedt R. H. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol // Cryobiology. – 1992. – V. 29. – P. 26-39.
14. А.с. 545312 (СССР). Состав для консервации донорских почек /Шумаков В.И., Онищенко Н.И., Крылова А.И., Штенгольд Е.Ш. и др. ; Оpubл. в Б.И. 1977, № 5.
15. Harris J.E., Byrnes P. Reversal of induced hydration of human corneas stored in a moist chamber at refrigeration temperatures for various periods of time// In: Corneal preservation: (Clinical and laboratory evaluation of current methods). - 1973.- P.81-95.
16. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Калугин Ю.В. О криозащите биологических объектов // Вестн. АН УССР. – 1975.- № 9. - С. 45 – 55.
17. Линник Т.П. Зависимость криопротекторной активности соединений ряда амидов от их физико-химических свойств: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.19 / ИПКиК НАНУ. - Харьков, 1986.-19 с.
18. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. - К: Наук. думка.-1982. -257 с.
19. Грищенко В.И., Лучко Н.А. Новые подходы к проблеме низкотемпературного консервирования репродуктивных клеток животных и человека// Пробл. криобиологии. - 1997. - №1-2. - С.61-67.
20. Дунаевская А.В. Влияние высоких скоростей охлаждения на морфофункциональные свойства спермиев человека при нормо- и олигоастеноспермии: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук:03.00.19 / ИПКиК НАНУ.- Харків, 2001.-19 с.

21. Gao D. Y., Liu J., Lin C. et al. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol // Hum. Reprod. – 1995. – V.10. – P. 1109 – 1122.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ И ИХ СМЕСЕЙ НА
МОРФОКИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СПЕРМИЕВ ЧЕЛОВЕКА
В.И.Грищенко, Н.Н.Чуб, В.Л.Родионова, Т.П.Линник, М.И.Крамар, Гапон А.А.,
П. Тодоров

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г.Харьков
Институт биологии и иммунологии и репродукции, г. София, Болгария

Была изучена зависимость основных характеристик спермы человека от растворов криопротекторов и многокомпонентных смесей, времени экспозиции с ними, их рН и осмотичности. Результаты проведенных исследований позволили оценить цитотоксическую роль ряда криопротекторов и их смесей на спермии человека, выявить стимулирующий эффект полиэтиленоксидов, независимо от молекулярной массы, на подвижность гамет.

Ключевые слова: спермии человека, криопротекторы, многокомпонентные смеси.

THE VARIOUS FREEZING PROTECTORS & MIXTURES IMPACT ON
MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF MAN SPERM
V.Grishchenko, N. Chub, V.Radionova, T. Linnik, M. Kramar, A. Gapon, P. Todorov,
The institute of freezing protection biology & medicine affiliated to the national
academy of science of Ukraine, Kharkov
The institute of biology & immunology, Sofia, Bulgaria

This article highlights the experimental research results on man semen characteristics subject to the various freezing protectors & mixtures use. Short & long term exposure of semen, pH & osmolarity were studied. Freezing protector toxicity was evaluated by the test data analysis. Freezing protectors & mixtures impact on man semen characteristics was defined. Polyethylene oxidation stimulation impact on motility rate of gametes was evaluated. Motility rate of gametes is non-dependent on molecular weight.

Key words: man sperm, freezing protectors, multi-component mixtures.