

ТЕОРЕТИЧНА І ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

<https://doi.org/10.35339/ekm.2019.84.03.01>
УДК 612.616:57.086.13: 678.746.5+547.458.2

А.А. Гапон, Е.В. Павлович, Т.А. Юрчук, В.И. Пиняев, М.П. Петрушко
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА В ПВП И САХАРОЗЕ

В данном исследовании изучали уровень жизнеспособности спермиев человека после криоконсервирования с непроникающими криопротекторами, которые не требуют удаления из суспензии клеток перед применением сперматозоидов во вспомогательных репродуктивных технологиях (ВРТ). В результате проведенных исследований установили, что использование сахарозы и поливинилпирролидона (ПВП) в различных комбинациях в качестве криозащитных агентов при замораживании сперматозоидов позволяет получить их выживаемость на уровне 60–80 %. Таким образом, криоконсервирование спермиев человека с использованием сахарозы и ПВП является перспективным для ВРТ, поскольку спермии можно использовать сразу после отогрева для оплодотворения ооцитов *in vitro*.

Ключевые слова: *сперматозоиды человека, поливинилпирролидон, сахароза, криоконсервирование, криопротекторы.*

Вступление

Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) широко применяются при лечении различных форм мужского бесплодия. Важным этапом ВРТ является низкотемпературное консервирование репродуктивных клеток и эмбрионов [1, 2]. Метод криоконсервирования мужских половых клеток приобретает особую актуальность для сохранения фертильности перед лучевой или химиотерапией и операционными мероприятиями. Криоконсервирование необходимо в донорских программах, поскольку использование спермиев донора для клинического применения невозможно без карантина, во время которого, образцы проходят скрининг на инфекционные агенты. Криоконсервирование спермиев, полученных при аспирации или экстракции яичка, или придатка яичка, применяется во избежание повторных биопсий. Этот метод позволяет сохранить фертильность тех пациентов, которые по тем или иным причинам подвергаются воздействию потенциально токсичных агентов, нарушающих гаметогенез.

В качестве «золотого стандарта» криоконсервирования при нормозооспермии принят

способ медленного замораживания сперматозоидов предварительно эквilibрированных в 5–10 % растворе глицерина, который является проникающим криопротектором [3]. Основным их принцип действия состоит в замещении внутриклеточной воды, которая при замерзании является основной причиной повреждения клеточных структур. В отличие от этого, непроникающие криопротекторы связывают внеклеточную воду. Большинство широко применяемых для криоконсервирования спермиев человека криопротекторов проявляют цитотоксичность, поэтому после замораживания их необходимо удалять из клеточной суспензии [4, 5].

Сахароза, в последнее время, широко применяется при криоконсервировании спермиев, поскольку она не цитотоксична и ее не нужно удалять из клеток [6]. ПВП относится к классу искусственных полимеров и является продуктом полимеризации N1-винилпирролидона и ацетилена. Молекулы ПВП представляют собой дифильные соединения, т. е. обладают гидрофильно-гидрофобными свойствами. В водных растворах молекулы этого соединения принимают хаотичную спиральную кон-

© А.А. Гапон, Е.В. Павлович, Т.А. Юрчук и др., 2019

фигурацию, что позволяет им гидратировать достаточное число молекул H_2O . В силу хорошо развитых гидратационных свойств ПВП характер замораживания растворов изменяется – процесс кристаллизации смещается в более низкотемпературную область. В эмбриологическом этапе ВРТ 10 % ПВП применяется для упрощения микроманипуляций со сперматозоидами, замедляя их подвижность при интрацитоплазматической инъекции в ооцит (ИКСИ).

Цель исследования – изучение выживаемости сперматозоидов после криоконсервирования с проникающими и непроникающими криопротекторами.

Материалы и методы

В исследование было включено 11 пациентов, проходивших лечение бесплодия в «ДРТ-клинике репродуктивной медицины», г. Харьков с их письменного, свободного и информированного согласия. На проведение исследований было получено разрешение и одобрение этического комитета ИПК и НАН Украины.

Эякулят получали после 3–5 дней сексуальной абстиненции. После разжижения проводили микроскопическую оценку эякулята при $\times 240$ с помощью камеры Macler («Sefi Medical Instruments», Израиль). Определяли количество спермиев в образце, процентное соотношение активноподвижных, подвижных, местнокачающихся и неподвижных спермиев. Для выделения фракции активноподвижных сперматозоидов использовали метод «swim up» с центрифугированием в двуслойном градиенте плотности (Sperm Grade, «Cook», США). После этого каждый анализируемый образец разделяли на 5 исследуемых групп. Спермии выдерживали 10 мин в криозащитных средах: группа 1 – 0,25М р-р сахарозы (Sigma-Aldrich, США), группа 2 – 0,25М р-р сахарозы и 10 % р-р PVP (Cook, США), группа 3 – 10 % PVP, группа 4 – 5 % глицерин (Sigma-Aldrich, США) + 10 % HSA (LifeGlobal, США). После экспозиции в криозащитных средах спермии поме-

щали в криовials («Nunc», Дания). Образцы охлаждали 20 мин в парах жидкого азота на уровне 10 см выше зеркала азота, после чего их помещали в жидкий азот.

Размораживали образцы на водяной бане (37° С). После полного исчезновения твердой фазы сперматозоиды переносили в камеру Маклера и определяли их выживаемость по количеству подвижных клеток.

Жизнеспособность сперматозоидов подсчитывали в мазках, окрашенных эозин-нигрозинном. Краситель содержал 0,9 % раствора NaCl и 0,67 г эозина в 100 мл раствора. Раствор перемешивали и нагревали на водяной бане до температуры 40° С, а затем добавляли 10 г нигрозина и доводили раствор до кипения [7].

Оценку уровня фрагментации ДНК проводили с помощью акридина оранжевого, который флуоресцирует зеленым, связываясь с двойной цепью ДНК, и красным, при взаимодействии с одноцепочечной ДНК [8].

Результаты анализировали при помощи программы «Win MDI v.2.8» (США). Все эксперименты и определения были проведены как минимум с трехкратным повторением. При статистической обработке результатов использовали однофакторный дисперсионный анализ и t-критерий Стьюдента при помощи программы Excel («Microsoft Office», США).

Результаты и обсуждение

После криоконсервирования (82,2±8,9), (88±9,9), (89,6±8,6) и (92,1±8,6) % спермиев сохранили свою жизнеспособность. Подвижными выявились (38,7±6,8), (33,3±6,9), (41,4±8,1) и (78,8±6,6) % спермиев в группах 1–4 соответственно (таблица).

Несмотря на высокую частоту выживаемости спермиев в группе 4, после центрифугирования и удаления криопротектора количество подвижных спермиев уменьшилось до (27,3±4,8) %. Поскольку применение непроникающих криопротекторов (КП) не требует их выведения, их подвижность сохраняется на

Подвижность и жизнеспособность сперматозоидов человека после криоконсервирования в безотмывочных криозащитных средах

Группы исследования	Количество подвижных спермиев, (%)	Количество жизнеспособных спермиев, (%)
1	38,7±6,8*	82,2±8,9*
2	33,3±6,9*	88,0±9,9*
3	41,4±8,1*	89,6±8,6*
4	78,8±6,6	92,1±8,6

Примечание. * – изменения статистически значимы по сравнению с соответствующим показателем группы 4 ($p < 0,05$).

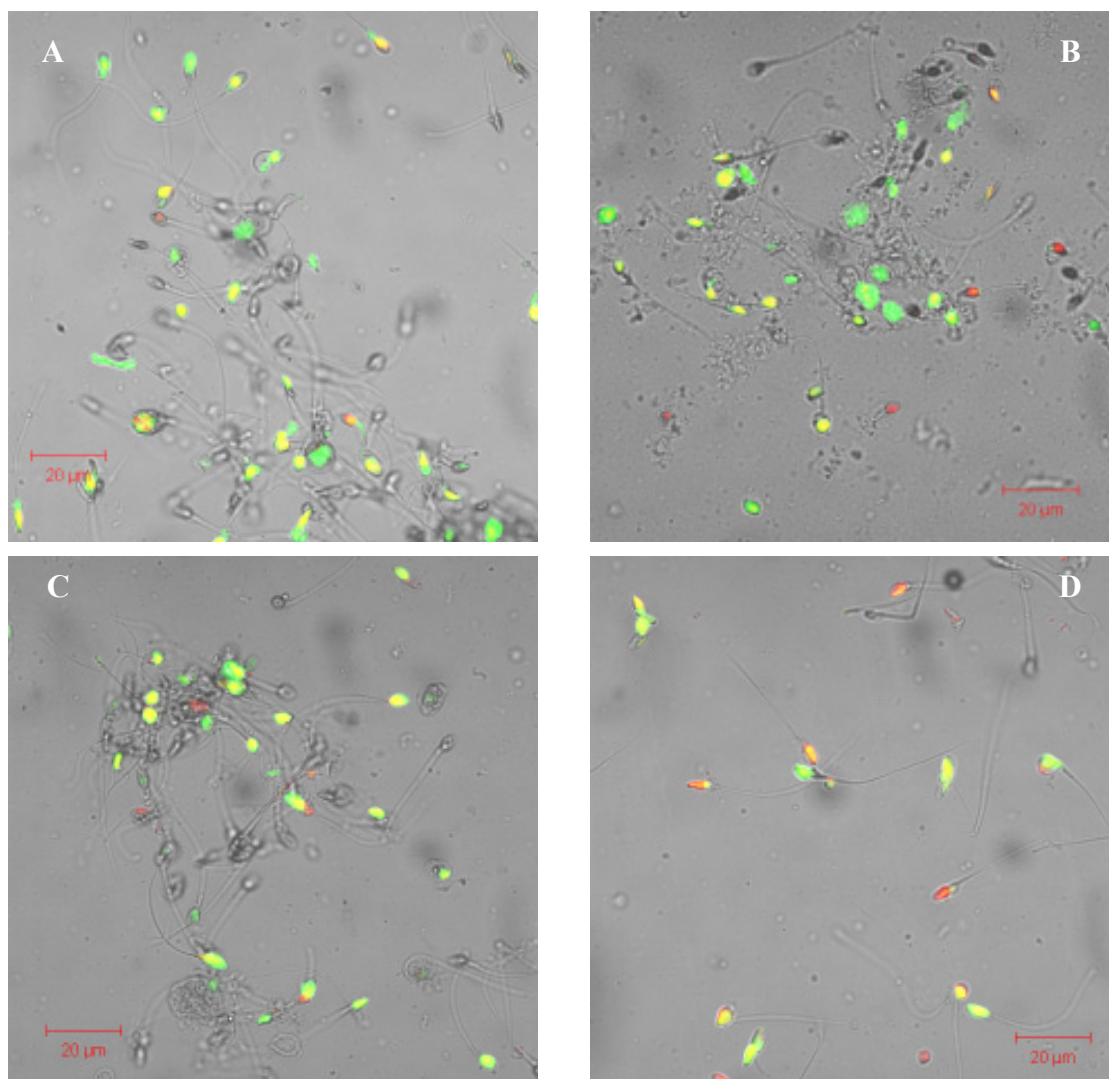
том же уровне. Таким образом, использование непроникающих КП в различных комбинациях позволяет получить выживаемость спермиев на уровне 60–80 %.

При этом, наибольшее количество клеток с деконденсированным хроматином наблюдалось в группе 4; в группах 1–3 – оставалось в пределах нормы (*рисунок*). Так, после криоконсервирования в группах 1–4 количество спермиев с деконденсированным хроматином составило (18,7±2,0), (23,1±2,5), (19,2±2,5) и (38,8±3,0) % соответственно, от общего количества клеток.

Криоконсервирование спермиев человека с сахарозой и ПВП в различных комбинациях является перспективным для ВРТ, поскольку спермии для оплодотворения ооцитов можно использовать немедленно после отогрева и без этапа удаления криозащитной среды [9].

Ранее было показано, что стволовые клетки, полученные из жировой ткани человека, могут быть криоконсервированы с использованием ПВП вместо диметилсульфоксида (ДМСО) [10]. Встречаются единичные сообщения о криоконсервировании эмбрионов мыши под защитой ПВП [11]. Показано, что ПВП является хорошей альтернативой другим криопротекторам, поскольку позволяет получить высокие показатели выживаемости спермы птиц [12].

Метод двухэтапного замораживания с глицерином является высокоэффективным. Однако известно, что глицерин является осмотически активным и медленно проникает через мембрану, что приводит к изменениям объема клеток, как вследствие добавления глицерина, так и потери воды во время цикла замораживания-оттаивания [5]. Кроме того,



Состояние ДНК сперматозоидов человека: А – группа 1, В – группа 2, С – группа 3, D – группа 4 (окраска акридин оранжевым)

выведение этого криопротектора из суспензии требует этапа центрифугирования, что снижает количество спермиев в образце, а это имеет принципиальное значение при работе с патоспермическими эякулятами.

Ранее нами было показано увеличение фрагментации ДНК в криоконсервированных спермиях человека [13]. Возможно, проникающие криопротекторы индуцируют фрагментацию ДНК, в отличие от непроникающих.

Степень влияния ПВП на морфофункциональные характеристики сперматозоидов требует дальнейшего изучения, поскольку ранее было показано, что ПВП индуцирует акросомальную реакцию [14] и может вызывать субмикроскопические изменения структуры сперматозоидов [15]. ПВП может подавлять

оплодотворение и эмбриональное развитие, поскольку молекулярная масса ПВП, используемого для ICSI, составляет 360 000 Да и его введение в ооцит при ICSI может препятствовать развитию эмбриона.

Выводы

В результате исследования установили, что использование сахарозы и ПВП в различных комбинациях позволяет получить выживаемость спермиев на уровне 60–80 %. Криоконсервирование спермиев человека с непроникающими КП (сахароза, ПВП) является перспективным для ВРТ, поскольку спермии для оплодотворения ооцитов можно использовать немедленно после отогрева и без этапа удаления криозащитной среды. Возможное влияние ПВП на развитие эмбрионов *in vitro* требует дальнейших исследований.

Литература

1. *Петрушко М. П.* Сучасний стан проблем криоконсервування репродуктивних клітин та ембріонів людини (за матеріалами наукової доповіді на засіданні Президії НАН України 17 травня 2017) / М. П. Петрушко // Вісник НАН України. – 2017. – № 7. – С. 44–53. – DOI: 10.15407/visn2017.07.044.
2. *Павлович О. В.* Оптимізація режиму відтавання криоконсервованої сперми людини при нормота патоспермії / О. В. Павлович, О. Б. Ревенко, Г. О. Гапон // Проблеми криобіології і криомедицини. – 2016. – № 26 (1). – С. 45–52. – DOI:10.15407/cryo26.01.045.
3. Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA Integrity, and implications for ART / M. Di Santo, N. Tarozzi, M. Nadalini, A. Borini // *Adv Urology*. – 2012. – DOI: 10.1155/2012/854837.
4. *Fahy G. M.* Cryoprotectant toxicity neutralization. – *Cryobiology*. – 2010. – № 60 (3). – С. 45–55.
5. *Best B.* Cryoprotectant toxicity: facts, issues and questions. – *Rejuvenation Res.* – 2015. – № 18 (5). – С. 422–436.
6. *Брагина Е. Е.* Руководство по сперматологии / Е. Е. Брагина, Р. А. Абдумаликова. – Москва: Сорек-полиграфия, 2002. – 93 с.
7. *Virant-Klun I.* Sperm single-stranded DNA, detected by acridine orange staining, reduces fertilization and quality of ICSI-derived embryos / I. Virant-Klun, T. Tomazevic, H. Meden-Vrtovec // *J Assist Reprod Genet.* – 2002. – № 19 (7). – С. 319–328. – DOI: 10.1023/A:1016006509036.
8. *Chohan K. R.* Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation / K. R. Chohan., J. T. Griffin, D. T. Carrell // *Andrologia*. – 2004. – № 36 (5). – С. 321–326.
9. Жизнеспособность сперматозоидов человека после криоконсервирования в безотмывочных средах / А. А. Гапон, Т. А. Юрчук, Е. В. Павлович [и др.] // Проблеми криобіології і криомедицини. – 2018. – № 28 (2). – С. 171. – DOI: 10.15407/cryo28.02.171.
10. Evaluation of polyvinylpyrrolidone as a cryoprotectant for adipose tissue-derived adult stem cells / S. Thirumala, X. Wu, J. M. Gimble, R. V. Devireddy // *Tissue Eng Part C Methods*. – 2010. – № 16 (4). – С. 783–792.
11. Effect of the polyvinylpyrrolidone concentration of cryoprotectant on mouse embryo development and production of pups: 7.5 % of PVP is beneficial for *in vitro* and *in vivo* development of frozen-thawed mouse embryos / C. G. Kim, H. Yong, G. Lee, J. Cho // *J Reprod Dev.* – 2008. – № 54 (4). – С. 250–253.
12. Individual cryopreservation with dimethyl sulfoxide and polyvinylpyrrolidone of ejaculates and pooled semen of three avian species / J. A. Herrera, J. A. Quintana, M. A. Lopez [et al.] // *Arch Androl.* – 2005. – № 51 (5). – С. 353–360.
13. Apoptosis and the processes of DNA fragmentation in native and cryopreserved human sperm cells with normo- and pathosperma / M. P. Petrushko, O. V. Pavlovich, V. I. Pinyaev [et al.] // *Cytol and Genet.* – 2017. – № 51 (4). – С. 52–56.
14. *Kato Y.* Effect of polyvinylpyrrolidone on sperm function and early embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in human assisted reproduction / Y. Kato, Y. Nagao // *Reprod Med Biol.* – 2012. – № 11 (4). – С. 165–176.

15. Intracytoplasmic sperm injection with polyvinylpyrrolidone: a potential risk / M. Jean, S. Mirallie, M. Boudineau [et al.] // *Fertil Steril.* – 2001. – № 76. – С. 0419–0420. – DOI: 10.1016/s0015-0282(01)01874-x.

References

1. Petrushko M.P. (2017). Suchasnye stan problem kriokonservuvanny reproduktyvnye klityn ta embrionov lyudyny (za materialy naukovoyi dopovidi na zasidanni Prezydyiyi NAN Ukrayiny 17 travnya 2017) [Current state of cryopreservation of reproductive cells and embryos (based on the scientific report at the meeting of the NAS Presidium May 17, 2017)]. *Visnyk Natsionalnoyi akademiyi nauk Ukrayiny – Bulletin of the National Academy of Sciences of Ukraine*, № 7, pp. 44–53 [in Ukrainian].
2. Pavlovich O.V, Revenko O.B, Gapon H.O. (2016). Optymizatsiya rezhymu vidtavannya kriokonservovanoi spermy lyudyny pry normo- ta patospermiyi [Optimization of thawing regimen for cryopreserved human sperm at normo- and pathospermia]. *Problemi kriobiologii i kriomeditsyny – Problems of cryobiology and cryomedicine*, № 26 (1), pp. 45–52 [in Ukrainian].
3. Di Santo M., Tarozzi N., Nadalini M., Borini A. (2012). Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA Integrity, and implications for ART. *Adv Urology*, DOI: 10.1155/2012/854837.
4. Fahy G.M. (2010). Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology*, № 60 (3), pp. 45–55.
5. Best B. (2015). Cryoprotectant toxicity: facts, issues and questions. *Rejuvenation Res.*, № 18 (5), pp. 422–436.
6. Bragina E.E., Abdumalikova R.A. (2002). Rukovodstvo po spermatologii [Guide of spermatology]. Moscow: «SOREK-poligrafia», 93 p. [in Russian].
7. Virant-Klun I., Tomazevic T., Meden-Vrtovec H. (2002). Sperm single-stranded DNA, detected by acridine orange staining, reduces fertilization and quality of ICSI-derived embryos. *J Assist Reprod Genet.*, № 19 (7), pp. 319–328.
8. Chohan K.R., Griffin J.T., Carrell D.T. (2004). Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. *Andrologia*, № 36 (5), pp. 321–326.
9. Gapon H.O., Yurchuk T.O., Pavlovich O.V., Pinyaev V.I., Petrushko M.P. (2018). Zhiznesposobnost spermatozoidov cheloveka posle kriokonservirovaniya v bezotmyvochnykh sredakh [Survival of human spermatozoa after cryopreservation with no-wash procedure]. *Problemi kriobiologii i kriomeditsyny – Problems of cryobiology and cryomedicine*, № 28 (2), p. 171 [in Russian].
10. Thirumala S., Wu X., Gimble J.M., Devireddy R.V. (2010). Evaluation of polyvinylpyrrolidone as a cryoprotectant for adipose tissue-derived adult stem cells. *Tissue Eng Part C Methods.*, № 16 (4), pp. 783–792.
11. Kim C.G., Yong H., Lee G., Cho J. (2008). Effect of the polyvinylpyrrolidone concentration of cryoprotectant on mouse embryo development and production of pups: 7.5 % of PVP is beneficial for in vitro and in vivo development of frozen-thawed mouse embryos. *J Reprod Dev.*, № 54 (4), pp. 250–253.
12. Herrera J.A., Quintana J.A., Lopez M.A., Betancourt M., Fierro R. (2005). Individual cryopreservation with dimethyl sulfoxide and polyvinylpyrrolidone of ejaculates and pooled semen of three avian species. *Arch Androl.*, № 51 (5), pp. 353–360.
13. Petrushko M.P., Pavlovich O.V., Pinyaev V.I., Volkova N.O., Podufali V.V. (2017). Apoptosis and the processes of DNA fragmentation in native and cryopreserved human sperm cells with normo- and pathosperma. *Cytol and Genet.*, № 51 (4), pp. 52–56.
14. Kato Y., Nagao Y. (2012). Effect of polyvinylpyrrolidone on sperm function and early embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in human assisted reproduction. *Reprod Med Biol.*, № 11 (4), pp. 165–176.
15. Jean M., Mirallie S., Boudineau M., Tatin C., Barriere P. (2001). Intracytoplasmic sperm injection with polyvinylpyrrolidone: a potential risk. *Fertil Steril.*, № 76, pp. 0419–0420, DOI: 10.1016/s0015-0282(01)01874-x.

Г.О. Гапон, О.В. Павлович, Т.О. Юрчук, В.І. Пиняєв, М.П. Петрушко

КРИОКОНСЕРВУВАННЯ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ЛЮДИНИ В ПВП ТА САХАРОЗІ

У даному дослідженні вивчали рівень життєздатності спермій людини після криоконсервування з непроникними криопротекторами, які не вимагають видалення з суспензії клітин перед застосуванням сперматозоїдів в ДРТ. В результаті проведених досліджень встановлено, що використання сахарози та ПВП в різних комбінаціях як криозахисних агентів при заморожуванні сперматозоїдів дозволяє отримати їх виживання на рівні 60–80 %. Таким чином, криоконсервування спермій людини

з використанням сахарози та ПВП є перспективним для ДРТ, оскільки спермії можна використовувати відразу після відігрівання для запліднення ооцитів *in vitro*.

Ключові слова: сперматозоїди людини, полівінілпіролідон, сахароза, кріоконсервування, кріопротектори.

A.A. Garon, E.V. Pavlovich, T.A. Yurchuk, V.I. Pinyayev, M.P. Petrushko

CRYOPRESERVATION OF HUMAN SPERM IN PVP AND SUCROSE

The aim of this study was to assess the viability of human sperm after cryopreservation with non-penetrating cryoprotectants that do not require removal from the suspension cells before using spermatozoa in ART. As a result of the studies, it was found that using of sucrose and PVP in various combinations as cryoprotectant agents for sperm freezing allows there to achieved 60–80 % of their survival rate. Thus, cryopreservation of human sperm using sucrose and PVP is promising for ART, since sperm can be used immediately after warming to fertilize oocytes *in vitro*.

Keywords: human sperm, polyvinylpyrrolidone, sucrose, cryopreservation, cryoprotectants.

Надійшла до редакції 08.08.2019

Контактна інформація

Гарон Ганна Олександрівна – аспірант, молодший науковий співробітник відділу кріобіології системи репродукції Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Адреса: Україна, 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Тел.: +380509648979.

E-mail: skagaron@gmail.com.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0000-0001-9372-3213>.

Павлович Олена Володимирівна – ст. науковий співробітник лабораторії кріоконсервування гамет та ембріонів відділу кріобіології системи репродукції Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Адреса: Україна, 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Тел.: +380983742011.

E-mail: lenapavlovich@gmail.com.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0019-7742>.

Юрчук Таїсія Олександрівна – старший науковий співробітник, в.о. завідувача лабораторії кріоконсервування гамет та ембріонів відділу кріобіології системи репродукції Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Адреса: Україна, 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Тел.: +380934591320

E-mail: taisiya.yur@gmail.com.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4993-9129>.

Піняєв Володимир Іванович – старший науковий співробітник лабораторії кріоконсервування гамет та ембріонів відділу кріобіології системи репродукції Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Адреса: Україна, 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Тел.: +380573733084.

E-mail: cryo@online.kharkiv.ua.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1889-5482>.

Петрушко Марина Павлівна – доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, завідувач відділу кріобіології системи репродукції Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Адреса: Україна, 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Тел.: +380506054605.

E-mail: petrushkomarina@gmail.com.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8331-5419>.