

# ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПЕРФТОРАНА ДЛЯ ГИПОТЕРМИЧЕСКОГО ХРАНЕНИЯ СПЕРМЫ ЧЕЛОВЕКА

УДК 612.616.004.4

Поступила 12.04.2010 г.



**А.А. Одинцов**, к.м.н., зав. отделением вспомогательных репродуктивных технологий<sup>1</sup>;

**И.Н. Кучков**, к.б.н., научный сотрудник<sup>2,3</sup>;

**И.В. Черкашина**, к.б.н., младший научный сотрудник<sup>2</sup>;

**Т.Е. Потемина**, д.м.н., зав. кафедрой патологической физиологии<sup>4</sup>;

**Д.И. Рыжаков**, д.м.н., профессор кафедры патологической физиологии<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Приволжский областной медицинский центр ФМБА России, Н. Новгород;

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина;

<sup>3</sup>Центр репродукции и генетики человека «Имплант», Харьков, Украина;

<sup>4</sup>Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород

Исследованы процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сперме человека в присутствии газотранспортного кровезаменителя «Перфторан» в условиях гипотермии. Установлен достоверный антиоксидантный эффект перфторана, который выражается в торможении накопления диеновых и триеновых конъюгатов, снижении концентрации малонового диальдегида и увеличении активности супероксиддисмутазы. Измерена общая антиоксидантная активность эякулята. Показано, что торможение развития процессов ПОЛ температурным фактором в сочетании с антиоксидантным эффектом перфторана в качестве компонента среды гипотермического хранения увеличивает общую антиоксидантную активность системы в целом.

**Ключевые слова:** спермии, гипотермия, перфторан, перекисное окисление липидов.

## English

## Effectiveness of a perftoran use for the human sperm hypothermal conservation

**A.A. Odintsov**, MD, Head of the Auxiliary Reproductive Technology Department<sup>1</sup>;

**I.N. Kuchkov**, PhD, Research Worker<sup>2,3</sup>;

**I.V. Cherkashina**, PhD, Junior Research Worker<sup>2</sup>;

**T.E. Potyomina**, MD, Head of the Pathological Physiology Department<sup>4</sup>;

**D.I. Ryzhakov**, MD, Professor, the Pathological Physiology Department<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Volga Regional Medical Center of the FMBA of Russia, Nizhny Novgorod;

<sup>2</sup>Institute Cryobiology and Cryomedicine Problems of the NAS of Ukraine, Kharkov, Ukraine;

<sup>3</sup>“Implant” Center for a Human Reproduction and Genetics, Kharkov, Ukraine;

<sup>4</sup>Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod

The investigation of the lipid peroxidation (LPO) processes in human sperm has been carried out in the presence of “Perftoran” gas transport blood substitute. It was conducted in hypothermia conditions. An antioxidant effect of perftoran proves to be reliable. It is observed to inhibit the dienic and trienic conjugate accumulation to decrease a malone dialdehyde concentration and to increase a superoxidisedismutase activity. A general antioxidant activity of ejaculate has been measured. It has been shown that an inhibition of the LPO process development by a temperature factor combined with a perftoran antioxidant effect as a hypothermal conservation medium component increases the whole antioxidant activity of the system.

**Key words:** spermatozoa, hypothermia, perftoran, lipid peroxidation.

Важную роль в развитии вспомогательных репродуктивных технологий играет использование криоконсервированной спермы человека. Гипотермия спермиев

решает вопрос проведения реинсеминации яйцеклеток в программе экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), интрацитоплазматической инъекции спермия,

Для контактов: Потемина Татьяна Евгеньевна, тел. раб. 8(831)465-46-58, тел. моб. +7 903-602-21-08; e-mail: potemin@pisem.net.

искусственной инсеминации пациентки спермой мужа или донора в удобное для врача время [1, 2]. Хранение спермиев предполагает использование криозащитных сред [3]. Состав и свойства таких сред обеспечивают сохранность морфофункциональных свойств клеток после отогрева, определяя положительный эффект лечебных процедур. Авторы в качестве такой среды предлагают использовать газотранспортную фторсодержащую эмульсию «Перфторан». Эффективность перфторана как компонента различных биологических сред была показана на подавляющем большинстве объектов, включая работы по культивированию клеток человека и животных [4].

Большинство представлений о механизмах криоповреждения спермиев человека связано с изменением биологических мембран как наиболее чувствительных к низкотемпературному воздействию [5]. Торможение развития процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) температурным фактором в сочетании с антиоксидантным эффектом перфторана в качестве компонента гипотермической среды увеличивает общую антиоксидантную активность системы в целом.

**Цель исследования** — изучение интенсивности процессов перекисного окисления липидов в сперме человека при хранении ее в гипотермической среде, содержащей перфторан.

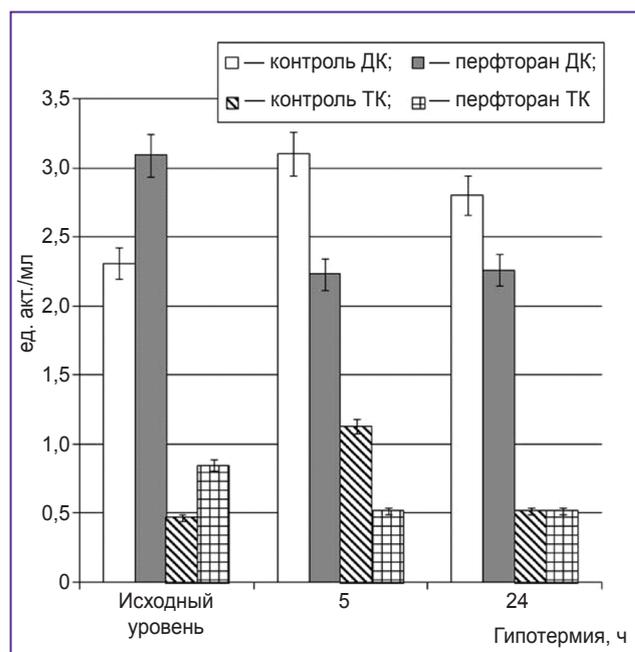
**Материалы и методы.** Объектом исследования служили 47 эякулятов человека при нормоспермии согласно стандартам ВОЗ, с перфтораном и без перфторана (контрольная группа). Параметры спермограмм получены при помощи автоматического анализатора спермы SQA-V (Израиль). Исследования проводили на разделенных эякулятах. Концентрацию малонового диальдегида (МДА) определяли по интенсивности окраски, образовавшейся в ходе реакции МДА с тиобарбитуровой кислотой, протекающей в кислой среде при высокой температуре [6], и выражали в мкмоль/л. Определение диеновых (ДК) и триеновых (ТК) конъюгатов проводили модифицированным методом Плацера [7]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по восстановлению красителя нитросинего тетразолия (Sigma, США) феназинметасульфатом [8]. Активность СОД выражали в условных единицах, за 1 усл. ед. принимали 50% ингибирования окислительно-восстановительной реакции. Для исследования общей антиоксидантной активности (АОА) использовали модельную систему суспензии желточных липопротеинов и выражали результаты в процентах от ингибирования 50% ПОЛ в модельной системе. Гипотермические условия создавали охлаждением образцов до 10°C. Отогрев осуществляли в термостате при 37°C. В работе использовался фармакопейный препарат «Перфторан» (Пушино, Россия) в конечной концентрации 40 об.% [9].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью набора средств анализа данных компьютерной программы Microsoft Excel 2007. В качестве критерия достоверности различий принимали уровень 95% ( $p < 0,05$ ).

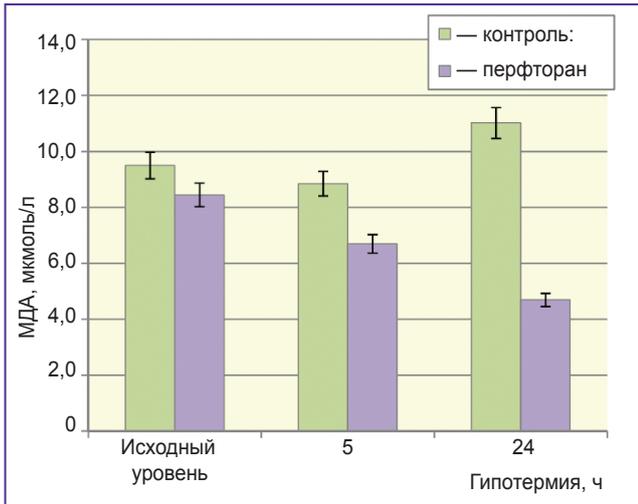
**Результаты и обсуждение.** При анализе изменения содержания ДК и ТК в семенной жидкости пос-

ле заморозки отмечено, что накопление ДК в опыте тормозится перфтораном, тогда как в контрольной суспензии распад этих продуктов трансформации полиненасыщенных жирных кислот существенно замедлен (рис. 1). Высокий уровень ДК в контроле свидетельствует не только об интенсивном метаболизме первичных продуктов ПОЛ, но также о замедленной нейтрализации этих токсичных веществ спермиями. Спустя 5 ч инкубации устанавливается новый уровень динамического равновесия, при котором накопление ДК в контрольной суспензии и снижение содержания этих продуктов в образцах с перфтораном достигло максимума. К 24 ч инкубации в контроле наблюдается плавное снижение содержания ДК, в то время как скорость накопления этих продуктов в эякуляте, содержащем перфторан, не изменяется, оставаясь на уровне 5 ч инкубации. Как видно из этого рисунка, скорость образования ТК в спермиях в обоих случаях отличается только достоверно низким содержанием по сравнению с ДК, что свидетельствует об активном вовлечении в процесс утилизации этих продуктов антиоксидантных ферментов спермиев. В образцах, содержащих перфторан, нарастание образования ТК также заканчивалось после 5 ч гипотермии. В интервале времени 5—24 ч достоверного изменения концентрации ТК не фиксировалось.

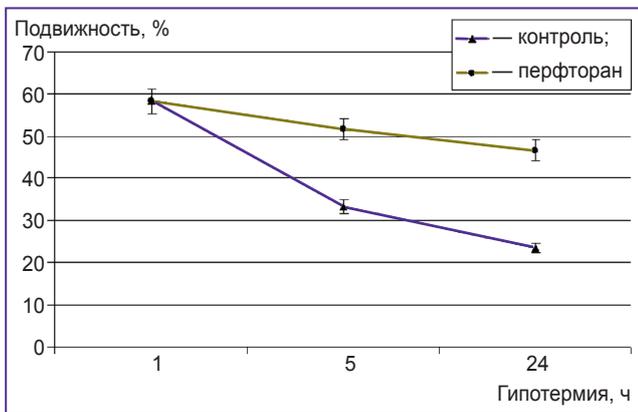
Известно [10], что ведущую роль в инициации процессов ПОЛ играет не абсолютное содержание кислорода в суспензии клеток, а эффективность механизмов его утилизации, соотношение между количеством генерируемых свободных радикалов и активностью систем их ингибирования. Развитие процессов ПОЛ в спермиях, имеющих тенденцию увеличивать свою интенсивность с течением времени, приводит к увеличению



**Рис. 1.** Содержание диеновых и триеновых конъюгатов в сперме человека в процессе гипотермического хранения;  $p < 0,05$



**Рис. 2.** Содержание МДА в эякуляте в процессе гипотермического хранения; \* — данные достоверны по отношению к контролю,  $p < 0,05$



**Рис. 3.** Подвижность спермиев человека в процессе гипотермического хранения;  $p < 0,05$

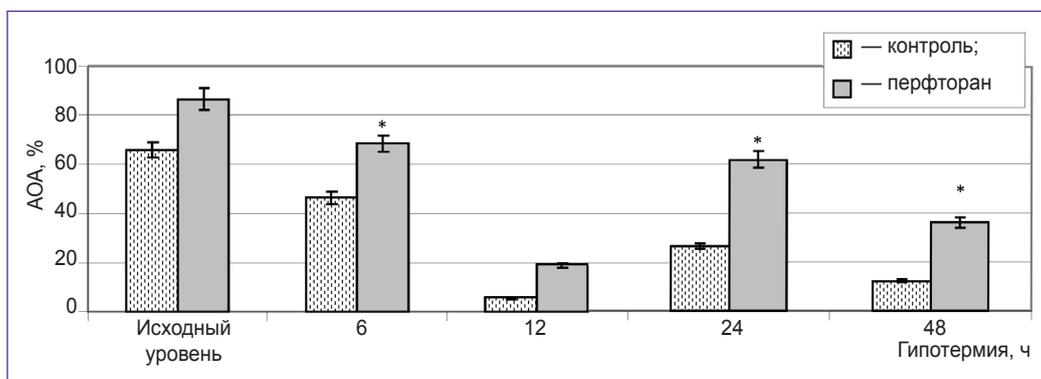
концентрации МДА в эякуляте: в среде, не содержащей перфторан, к 24 ч наблюдался максимум этого продукта (рис. 2). Напротив, при добавлении перфторана в раствор уровень МДА снижался, что удалось достоверно зафиксировать после 5 ч гипотермии. К 24 ч инкубации концентрация МДА снизилась почти в два раза

по отношению к его содержанию в контрольной суспензии. Данные содержания МДА в сперме согласуются с динамикой накопления ДК и ТК — предшественников ТБК-активных продуктов.

Полученные данные содержания ДК, ТК и МДА в суспензии позволяют говорить об антиоксидантном эффекте перфторана в отношении спермиев человека при гипотермическом хранении. Характерно, что накопление продуктов ПОЛ к 24 ч прямо пропорционально снижению подвижности спермиев в контроле и опыте. При этом в контрольных образцах процент подвижных клеток был достоверно ниже (рис. 3).

Установлено, что в нативном состоянии АОА в контроле имеет высокие значения — 65,7% и равномерно снижается в течение 12 ч инкубации (рис. 4). При внесении в среду перфторана динамика изменения общей АОА носит тот же характер, однако ее значения достоверно выше по сравнению с контролем — 86,4 и 68,7% соответственно. Мы выяснили, что сперма имеет довольно высокий собственный антиоксидантный потенциал. Антиоксидантный эффект газотранспортного кровезаменителя проявляется сразу и остается на достаточно высоком уровне после 6 ч, а спустя 12 ч инкубации уменьшается, но превышает контрольные значения в два раза. В случае гипотермического хранения после 24 ч инкубации АОА в опытных образцах оставалась выше, чем в контрольной группе. В суспензии, не содержащей перфторан, этот показатель был достоверно ниже. Мы связываем данное наблюдение прежде всего с замедлением общего метаболизма спермиев при снижении температуры. С другой стороны, неспецифическое гидрофобное взаимодействие субмикронных частиц с плазматической мембраной спермия, по нашему мнению, является основным звеном криозащиты перфторана в условиях гипотермического хранения, так как в отличие от процесса глубокого охлаждения грубые нарушения структуры и функции спермиев в этом случае отсутствуют.

Известно, что общий уровень ПОЛ в спермиях *in vitro* в основном определяется концентрацией кислорода и температурой внеклеточной среды [11]. Данные изменений АОА показывают, что инкубация спермиев в среде с перфтораном устанавливает динамическое



**Рис. 4.** Общая антиоксидантная активность спермы при инкубации в разных средах; \* — достоверно по отношению к контролю,  $p < 0,05$

**Изменение активности супероксиддисмутазы и подвижности спермиев при гипотермическом хранении (X±x)**

| Гипотермия, ч    | Контроль                 |                         | Перфторан                |                         |
|------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
|                  | Активность СОД, усл. ед. | Подвижность спермиев, % | Активность СОД, усл. ед. | Подвижность спермиев, % |
| Исходный уровень | 158±20                   | 65±5                    | 154±25                   | 65±5                    |
| 5                | 160±12                   | 21±3                    | 140±23                   | 40±7                    |
| 24               | 150±10                   | 0                       | 122±11*                  | 25±3                    |

\* — достоверность различий значений в контроле и опыте, p<0,05.

равновесие между этими факторами, увеличивая переживаемость клеток.

Положительная корреляция между активностью СОД в спермиях, числом подвижных клеток и их переживаемостью обнаружена во многих исследованиях [11—13]. Как показывают результаты наших экспериментов, активность СОД в среде гипотермического хранения, содержащей перфторан, была статистически значимо ниже по отношению к контролю только после 24 ч инкубации (см. таблицу). До этого времени активность фермента была стабильно высока, хотя наблюдалась недостоверная тенденция к ее снижению. Напротив, наблюдение за кинетическими характеристиками спермиев показало снижение числа подвижных клеток со временем в обеих исследуемых группах. Эти данные могут свидетельствовать об интенсивном образовании супероксиданион-радикала (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) на начальных этапах хранения спермиев. Достоверно низкая активность СОД после 24 ч инкубации соответствовала наличию подвижных спермиев в образце с перфтораном, в то время как в контроле подвижных клеток не наблюдалось.

**Заключение.** Газотранспортная фторсодержащая эмульсия «Перфторан» обладает антиоксидантным эффектом, препятствуя накоплению первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов в сперме человека. Использование перфторана в качестве компонента среды для гипотермического хранения в концентрации 40 об.% увеличивает переживаемость спермиев человека и повышает эффективность клинического применения клеток, хранящихся в условиях низких положительных температур.

Методика инкубирования спермиев человека в среде с перфтораном может быть использована во вспомогательных репродуктивных технологиях для долгосрочного хранения образцов в условиях гипотермии с последующим восстановлением функциональной активности спермиев.

**Литература**

1. Andersen N., Goossens V., Bhattacharya S. et al. Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registers by ESHRE. The European IVF Monitoring Programme (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Human Reproduction 2009; 1(1): 1—21.
2. Грищенко В.И., Петрушко М.П., Пиняев В.И. и др. Использование спермиев, хранившихся в условиях гипотермии, для реинсеминации неоплодотворенных ооцитов в программе ЭКО. Проблемы криобиологии 1998; 3: 48—52.
3. Цуцаева А.А., Аграненко В.А., Федорова Л.И. Криоконсервирование клеточных суспензий. Под ред. А.А. Цуцаевой. Киев: Наукова думка; 1983; 240 с.
4. Иваницкий Г.Р., Архипов В.В., Белоярцев Ф.Ф., Лежнев Э.И. Культивирование животных клеток на жидких перфторуглеродах. ДАН 1981; 28(1): 225—228.
5. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. Киев: Наукова думка; 1982; 257 с.
6. Gomez E., Irvine D.S., Aitken R.J. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. Int J Androl 1998 April 1; 21(2): 81—94.
7. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. В 2 т. Т. 2. Минск: Беларусь; 2000; 463 с.
8. Nissen H., Kreysel H.W. Superoxide dismutase in human semen. Klin Wochenschr 1983; 61: 63—65.
9. Черкашина И.В. Влияние перфторана на функциональные характеристики спермиев человека при гипотермическом хранении и криоконсервации. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Харьков; 2007.
10. De Lamirande E., Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. Hum Reprod 1995; 10: 15—21.
11. Zini A., de Lamirande E., Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. Int J Androl 1993; 16(3): 183—188.
12. Kobayashi T., Miyazaki T., Natori M., Nozawa S. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. Human Reproduction 1991; 6(7): 987—991.
13. Иваницкий Г.Р., Воробьев С.И., Макаров К.П., Архипов В.В. Сравнительное изучение перфторуглеродных эмульсий. В кн.: Физиологическая активность фторсодержащих соединений (эксперимент и клиника). Ред. Г.Р. Иваницкий, С.И. Воробьев. Пуцзино; 1995; с. 33—41.