

# ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ КРИОЗАЩИТНЫХ СРЕД И СПОСОБОВ ЗАМОРАЖИВАНИЯ СПЕРМИЕВ ЧЕЛОВЕКА

УДК 612.616.004.4

Поступила 14.04.2011 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

Исследована эффективность использования трех криосред — глюкозо-желточно-цитратной (ГЖЦ), Spermacare и Upgraded B2 INRA medium в качестве основы криоконсервантов для спермиев человека — и двух способов замораживания спермиев — с медленными и сверхбыстрыми скоростями охлаждения. Показан достоверно высокий процент оплодотворения ооцитов и развития эмбрионов при использовании сред ГЖЦ и Upgraded B2 INRA medium в сочетании со сверхбыстрыми скоростями охлаждения образцов спермы.

**Ключевые слова:** спермии, ооциты, сверхбыстрое охлаждение, криоконсервант, глюкозо-желточно-цитратная среда, Spermacare, Upgraded B2 INRA medium.

## English

## The assessment of efficiency of cryoprotective media and the methods of freezing of human sperm cells

**A.A. Odintsov**, PhD, Head of the Department of Auxiliary Reproductive Technologies<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. Potemina**, D.Med.Sc., Head of the Department of Pathological Physiology<sup>4</sup>;

**D.I. Ryzhakov**, D.Med.Sc., Professor, the Department of Pathological Physiology<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

There have been studied the use efficiency of three cryomedia — glucose-yolk-citrate (GYC), Spermacare and Upgraded B2 INRA medium as the basis of cryopreservative for human sperm cells and the two methods of sperm cells freezing with slow and ultrafast speed of cooling. There has been obtained significantly high percentage of oocyte fertilization and embryogenesis using GYC and Upgraded B2 INRA medium combined with ultrafast speeds of sperm samples cooling.

**Key words:** sperm cells, oocytes, ultrafast cooling, cryopreservative, glucose-yolk-citrate media, Spermacare, Upgraded B2 INRA medium.

Для контактов: Одинцов Андрей Александрович, тел. моб. +7 910-790-08-13; e-mail: a.odintcov@mail.ru.

Эмпирические методы криоконсервирования спермиев, разработанные в 50-х гг. XX в., продолжают использоваться и сегодня, обеспечивая около 50% выживаемости и оплодотворяющей способности отогретых клеток, с высокой индивидуальной вариабельностью [1, 2]. Низкие показатели функциональной активности отогретых спермиев человека обусловлены отсутствием оптимизации процессов криоконсервирования образцов, которые включают взаимодействие клеток с криоконсервантом, охлаждение и отогрев. Актуальность данных исследований связана не только с использованием криоконсервированных образцов спермы во вспомогательных репродуктивных технологиях, но и с увеличением в последнее время показаний к замораживанию и длительному хранению спермы человека. К остро нуждающимся в личном криобанке спермы относятся мужчины, состоящие в группе риска по медико-социальным показаниям. Это лица, которым предстоит химиотерапия или высокодозовое облучение, операции на половых органах (хирургическая коррекция репродуктивных проблем, стерилизация, варикоцеле, гидроцеле и др.), лечение генетических и профзаболеваний, участие в боевых действиях [3, 4].

Существуют и особые случаи — посмертное получение сперматозоидов после констатации смерти мозга или в течение 24 ч после смерти тела [5, 6].

**Материалы и методы.** Проведено 60 циклов экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) с использованием криоконсервированной спермы доноров. Эякуляты оценивали согласно рекомендациям ВОЗ [7]. Яйцеклетки аспирировали пункцией яичников у женщин после стимуляции суперовуляции. Получено 490 ооцитов. В работе использовали ооциты на стадии М II. Эмбрионы получены после инсеминации зрелых ооцитов активно-подвижными спермиями, выделенными из эякулята методом центрифугирования в градиенте плотности среды *SupraSperm* (*Origio MediCult*) с последующим переносом трех «лучших» в полость матки.

В качестве криоконсервантов выбраны глюкозо-желточно-цитратная среда (ГЖЦ), солевой буфер на основе *HEPES — Spermacare<sup>tm</sup>* (Франция) и культуральная среда *Upgraded B2 INRA medium* (Франция), к которым в качестве криопротектора был добавлен глицерин в следующем объеме:

*Spermacare<sup>tm</sup>* и *Upgraded B2 INRA medium* — по 4,5 мл, глицерин — по 0,5 мл.

ГЖЦ: глюкоза — 1,5 г; цитрат натрия трехзамещенный — 1,3 г; глицерин — 15 мл; глицин — 1,3 г; желток куриного яйца — 20 мл; вода деионизованная — 65 мл.

Криоконсерванты добавлялись к сперме так, чтобы конечная концентрация глицерина в замораживаемом образце составляла 5%. Для замораживания использовали медленное охлаждение и сверхбыстрое. Реализация медленного охлаждения проводилась с помощью программного замораживателя *Cryologic CL8800* (Австралия) (рис. 1), сверхбыстрые скорости охлаждения достигались погружением образцов в охлажденный до температуры жидкого хладагента твердый хладоноситель [8].

Образцы отогревали на водяной бане при 37°C. О сохранности морфофункциональных свойств спермиев после отогрева, сравнительной эффективности криозащитных сред и способов охлаждения судили по показателям подвижности и переживаемости спермиев, а также оплодотворяющей способности.

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

**Результаты и обсуждение.** Дан-

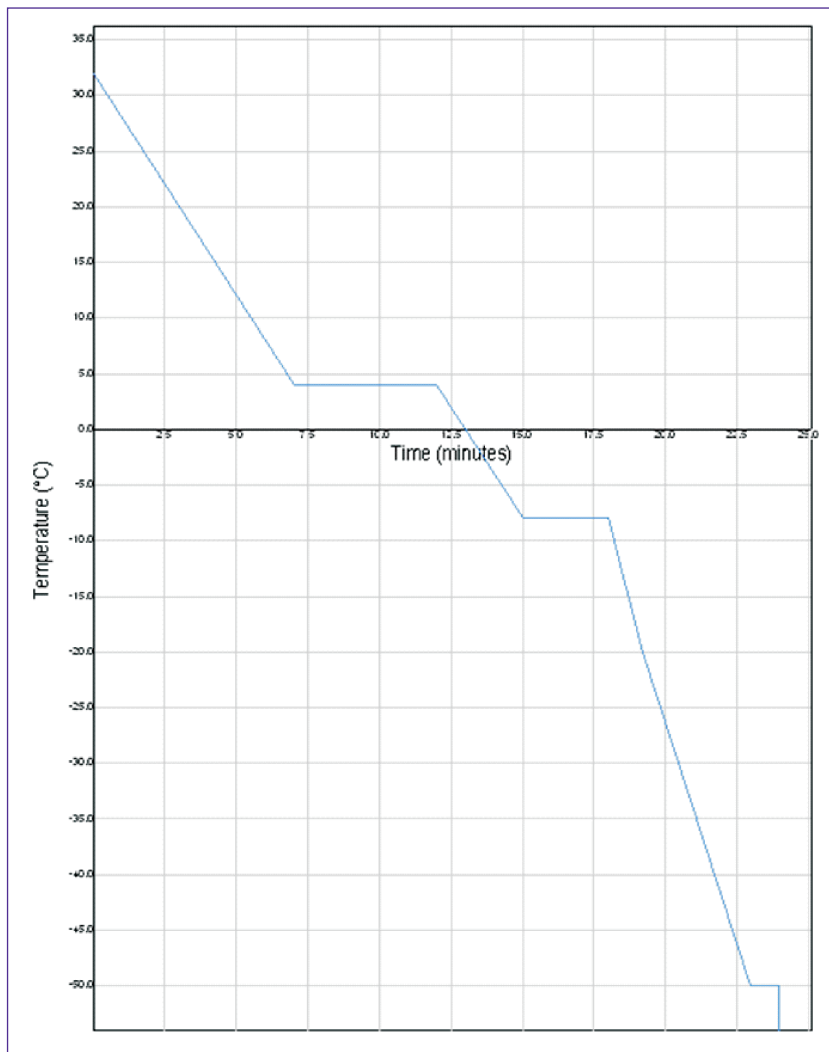


Рис. 1. Протокол медленного охлаждения образцов спермы

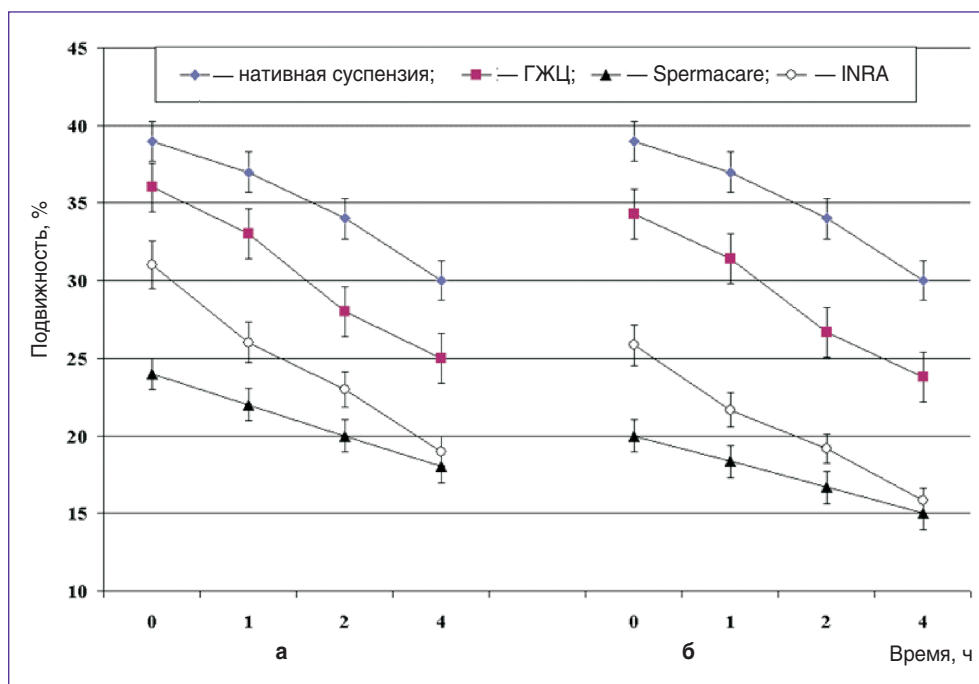


Рис. 2. Данные подвижности и переживаемости отогретых спермиев после криоконсервирования в условиях сверхбыстрого (а) и программного (б) охлаждения с использованием разных криозащитных сред

ные подвижности и переживаемости отогретых спермиев (рис. 2) свидетельствуют о преимуществе использования ГЖЦ в качестве среды для замораживания образцов. Реализация криозащитных свойств этого криоконсерванта позволила получить высокий процент подвижных спермиев для двух режимов охлаждения. Для двух других криозащитных сред наиболее оптимальным оказался способ сверхбыстрого охлаждения. Мы полагаем, что сочетание непроникающих криопротекторов из яичного желтка и глицерина обеспечивает достаточный уровень криозащиты среды ГЖЦ. Высокие показатели криозащиты были зафиксированы и для криоконсерванта на основе культуральной среды Upgraded B2 INRA medium. Самые низкие показатели подвижности и переживаемости отогретых образцов спермы получены в случае использования среды Spermacare. Данная тенденция прослеживалась как при сверхбыстром охлаждении образцов, так и в случае программного замораживания.

Таким образом, криоконсерванты, содержащие в своем составе определенное количество белковых фракций (ГЖЦ, Upgraded B2 INRA medium), в отличие от среды с соевым буфером (Spermacare), проявляли достоверно более высокую степень криозащиты спермиев. Переживаемость клеток имела сходную динамику и не зависела статистически значимо от способа охлаждения и использованных криозащитных сред.

Данные оплодотворяющей способности спермиев (см. таблицу) убедительно свидетельствуют, что использование активно-подвижной фракции криоконсервированных клеток, выделенных из отогретых образцов, где в качестве криоконсерванта применялись среды ГЖЦ и Upgraded B2 INRA medium, дает досто-

**Данные оплодотворяющей способности спермиев криоконсервированных с использованием разных криоконсервантов и двух режимов охлаждения, %**

Стадия дробления	ГЖЦ	Upgraded B2 INRA medium	Spermacare
Медленное охлаждение			
Пронуклеусы	85,3±2,2	75,5±2,1	60,1±1,8*
4 бластомера	80,1±3,2	70,5±3,2	52,2±2,2
8 бластомеров	80,2±2,1	68,7±2,9	50,0±2,6
Сверхбыстрое охлаждение			
Пронуклеусы	95,0±2,2	85,3±1,9	70,5±1,8
4 бластомера	90,6±2,0	82,0±4,2	65,0±3,6
8 бластомеров	90,1±2,8	80,3±2,7	65,2±3,9

\* Проводилась процедура ICSI.

верно высокий процент оплодотворенных ооцитов. Использование криоконсерванта на основе солевого буфера Spermacare приводит к низким показателям оплодотворения ооцитов отогретыми спермиями. В некоторых случаях по показателям качества отогретых образцов спермы выполнялась интрацитоплазматическая инъекция спермия в ооцит (ICSI).

Мы полагаем, что важным этапом использования криоконсервированных спермиев для оплодотворения ооцитов является не столько реализация криозащиты на этапах охлаждения клеточной суспензии, сколько обеспечение процессов искусственной капацитации спермиев при их эквilibрации в криозащитной среде. Использование сверхбыстрых (5000°С/мин) скоростей охлаждения спермиев увеличивает процент оплодотворения.

**Заключение.** Различия в эффективности криозащитных сред по данным подвижности и переживаемости

спермиев прямо пропорциональны оплодотворяющей способности ооцитов и развитию эмбрионов. Использование криоконсервантов на основе культуральных сред, содержащих биологически активные вещества, наиболее целесообразно. Можно предположить, что сверхбыстрое охлаждение образцов приводит к витрификации, что повышает сохранность спермиев после отогрева и является более эффективным методом замораживания по сравнению с медленным охлаждением.

### Литература

1. *Keel B.A., Webster B.W.* Semen cryopreservation methodology and results. In: Donor insemination. C.L.R. Barratt, I.D. Cooke (editors). Cambridge: Cambridge University Press; 1993; 71—96.
2. *Brotherton J.* Cryopreservation of human semen. *Arch Androl* 1990; 25(2): 181—195.
3. *Revel A., Revel-Vilk S.* Fertility preservation in young cancer patients. *J Hum Reprod Sci* 2010 Jan; 3(1): 2—7.
4. *Bredkjaer H.E., Grudzinskas J.G.* Cryobiology in human assisted reproductive technology. Would Hippocrates approve? *Early Pregnancy* 2001 Jul; 5(3): 211—213.
5. *Weber B., Kodama R., Jarvi K.* Postmortem sperm retrieval: the Canadian perspective. *J Androl* 2009 Jul—Aug; 30(4): 407—409.
6. *Kramer A.C.* Sperm retrieval from terminally ill or recently deceased patients: a review. *Canadian J Urol* 2009 Jun; 16(3): 4627—4631.
7. World Health Organization Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
8. *Одинцов А.А., Кучков И.Н., Черкашина И.В.* Патент №2257710 RU, А01N1/02. Способ криоконсервации спермы человека.