

Влияние факторов криоконсервирования на морфофункциональные характеристики спермы человека

Н.А. ВОЛКОВА¹, Е.В. ПАВЛОВИЧ¹, А.А. ГАПОН¹, О.Т. НИКОЛОВ², М.П. ПЕТРУШКО¹

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

Effect of Cryopreservation Factors on Morphofunctional Characteristics of Human Sperm

N.A. VOLKOVA¹, E.V. PAVLOVICH¹, A.A. GAPON¹, O.T. NIKOLOV², M.P. PETRUSHKO¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²V.N. Karazin Kharkov National University, Kharkov, Ukraine

Подвижность спермы человека после криоконсервирования является одним из показателей, определяющих успех вспомогательных репродуктивных технологий. В связи с этим важна разработка новых подходов повышения функционального состояния спермы человека после криоконсервирования, которые заключаются в сочетании криопротекторов эндо- и экзоцеллюлярного типов, а также применении электромагнитного излучения миллиметрового диапазона (КВЧ).

Цель работы – изучение влияния криозащитных сред и электромагнитного излучения КВЧ диапазона на спермии человека после низкотемпературного хранения.

В работе использовали эякуляты человека при астеноспермии, которые криоконсервировали по трехэтапной программе. В качестве криопротекторных сред использовали среды: 1–4% глицерин; 2–5% глицерин с 5% ДМСО; 3–8% глицерин с 2% ПЭО-400. Во всех случаях в состав сред входил 20% БСА. Отогрев осуществляли на водяной бане при 38°C. В образцах оценивали подвижность (фракция $a + v$), жизнеспособность (окрашивание нигрозином и эозином), состояние хроматина (тест 7AAD) сразу после отогрева и облучения КВЧ ($\lambda = 7,1 \text{ мм}$, $f = 42,25 \text{ ГГц}$, $P = 10^{-4} \text{ Вт/см}^2$) в течение 5, 10 и 15 мин.

Подвижность сперматозоидов после криоконсервирования под защитой среды 1 составляла $40 \pm 4\%$, среды 2 – $25 \pm 6\%$, среды 3 – $20 \pm 4\%$. При этом целостность мембраны и состояние ядра во всех исследуемых образцах после криоконсервирования достоверно не изменялись относительно нативных образцов. Облучение образцов спермы после криоконсервирования в течение 5 мин приводило к увеличению подвижности клеток в среде 1 на $10 \pm 2\%$, 2 – на $4 \pm 1\%$, в среде 3 изменений относительно исходных показателей установлено не было. Увеличение времени облучения до 10 и 15 мин не приводило к достоверным изменениям подвижности спермиев. Данные, полученные с использованием теста на включение 7AAD (FACS-анализ), коррелировали с показателями подвижности и жизнеспособности.

Таким образом, представленные результаты показали, что использование смеси 4% глицерина с 20% БСА позволяет сохранить достаточно высокий процент подвижных клеток после низкотемпературного консервирования. Применение КВЧ облучения приводило к увеличению содержания активно-подвижной фракции криоконсервированных спермиев человека без изменения состояния мембраны и ядерного хроматина.

The index of human sperm motility after cryopreservation is one of the important factors determining the successful outcome in assisted reproductive techniques. In this connection the development of new approaches to increase functional state of human sperm after cryopreservation, consisting in the use of combinations of cryoprotectants of endo- and exocellular types, as well as application of electromagnetic irradiation of millimeter range (EHF) is an actual one.

The research aim was to study the effect of cryoprotective media and electromagnetic irradiation of EHF range on human spermatozoa after low temperature storage.

We studied the human ejaculates of patients with astenospermia. Cryopreservation was performed according to three-step program. As cryoprotective media there were used: N1 – 4% glycerol, N2 – 5% glycerol with 5% DMSO; N3 – 8% glycerol with 2% PEO-400. In all the cases the media comprised 20% BSA. Thawing was done in water bath at 38°C. In the samples there were assessed motility (fractions $a + b$), viability (nigrosin and eosin staining), chromatin state (7AAD test) right after thawing and EHF irradiation ($\lambda = 7.1 \text{ mm}$, $f = 42.25 \text{ GHz}$, $P = 10^{-4} \text{ W/cm}^2$) during 5, 10 and 15 min.

Spermatozoa motility after cryopreservation under protection of the medium N1 made $40 \pm 4\%$, for medium N2 it was $25 \pm 6\%$ and $20 \pm 4\%$ for the N3 one. Herewith the membrane integrity and state of nucleus in all the studied samples after cryopreservation did not statistically and significantly change in respect of native samples. Irradiation of sperm samples after cryopreservation during 5 min resulted into a rise in the motility in case of the medium N1 by $10 \pm 2\%$, medium N2 by $4 \pm 1\%$ and in case of the medium N3 no changes were found in respect of initial indices. The increase of irradiation time up to 10 and 15 min did not result in statistically significant changes in spermatozoa motility. The data obtained using the test for 7AAD inclusion (cytofluorimetric analysis) correlated with motility and viability indices.

Thus the presented results have shown that the use of the mixture of 4% glycerol and 20% BSA enabled the preservation of high percentage of motile cells after low temperature storage. Application of EHF irradiation led to the rise in the content of actively motile fraction of cryopreserved human spermatozoa with no change in the state of membrane and nuclear chromatin.