

Жизнеспособность сперматозоидов человека после криоконсервирования в безотмывочных средах

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

Survival of Human Spermatozoa After Cryopreservation with No-Wash Procedure

A.A. Gapon, T.A. Yurchuk., E.V. Pavlovich, V.I. Piniayev, M.P. Petrushko
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine,
Kharkiv, Ukraine

Криоконсервирование сперматозоидов является составной частью вспомогательных репродуктивных технологий. В случае нормозооспермии спермии криоконсервируют в 5–10%-м растворе глицерина с использованием медленных скоростей охлаждения. Однако после отогрева проникающий криопротектор (КП) необходимо выводить из клетки. Это достигается путем центрифугирования и удаления супернатанта. Эти манипуляции оказывают отрицательное влияние на морфофункциональные характеристики спермиев и увеличивают риск потери сперматозоидов. Поэтому необходима разработка альтернативных методов криоконсервирования с использованием КП, не требующих этапа отмывки. Поливинилпирролидон (PVP) и сахароза применяются для интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит, но в то же время они являются непроникающими КП.

Цель работы – изучение жизнеспособности спермиев человека после криоконсервирования с использованием непроникающих криопротекторов, без этапа их удаления.

В работе использовали эякуляты 11 мужчин, которые дали информированное согласие на проведение экспериментов. Выделенная активноподвижная фракция спермиев была разделена на четыре группы. Спермии выдерживали 10 мин в криозащитных средах: группа 1 – 0,25М раствор сахарозы («Sigma-Aldrich», США), группа 2 – 0,25М раствор сахарозы и 10%-й раствор PVP («Cook», США), группа 3 – 10% PVP, группа 4 – 5%-й глицерин («Sigma Aldrich», США) + 10% HSA (LifeGlobal, США). Спермии помещали в криовials («Nunc», США), которые охлаждали со скоростью 150 град/мин до -80°C . После чего помещали в жидкий азот. Криовials отогревали на водяной бане (37°C) в течение 10 мин. Жизнеспособность сперматозоидов после размораживания определяли, используя тест на гипоосмотическое набухание (HOS-тест). Кроме того, оценивали подвижность спермиев в отогретых образцах.

После криоконсервирования ($82,2 \pm 8,9$); ($88 \pm 9,9$); ($89,6 \pm 8,6$) и ($92,1 \pm 8,6$)% спермиев сохранили свою жизнеспособность; подвижность – ($38,7 \pm 6,8$); ($33,3 \pm 6,9$); ($41,4 \pm 8,1$) и ($78,8 \pm 6,6$)% в группах 1–4 соответственно. Несмотря на высокую частоту выживаемости спермиев в группе 4, после центрифугирования и удаления криопротектора количество подвижных спермиев уменьшилось до ($27,3 \pm 4,8$)%.

Таким образом, использование непроникающих КП в различных комбинациях позволяет получить выживаемость спермиев 60–80%. Криоконсервирование спермиев человека с непроникающими КП (сахароза, PVP) является перспективным для ВРТ, поскольку спермии для оплодотворения ооцитов можно использовать немедленно после отогрева и без этапа удаления криозащитной среды.

Cryopreservation of spermatozoa is an integral part of the assisted reproductive technologies (ART). In normozoospermia, the spermatozoa are cryopreserved in 5–10% glycerol solution using low cooling rates. However, after warming, penetrating cryoprotective agents (CPA) must be removed from the cell. This is achieved by centrifuging and removing the supernatant. These manipulations negatively affect the morphofunctional characteristics of the sperm and increase the risk of spermatozoa losing. Therefore, it is necessary to develop alternative cryopreservation methods using CPAs, which do not require a wash-out procedure. Polyvinylpyrrolidone (PVP) and sucrose are used for intracytoplasmic sperm injection into oocyte. At the same time, they were effective as extracellular CPAs.

The research aim was to study the viability of human sperm after cryopreservation using non-penetrating cryoprotectants without wash-out procedure. The patients gave their informed consent for the experiment.

In the study 11 male ejaculates were used. The isolated active-moving fraction of sperm was divided into four groups. Sperm was exposed for 10 minutes in cryoprotective media: group 1 – 0.25 M sucrose (Sigma-Aldrich, USA), group 2 – 0.25 M sucrose solution and 10% PVP (Cook, USA), group 3 – 10% PVP, group 4 – 5% glycerol (Sigma-Aldrich, USA) + 10% HSA (LifeGlobal, USA). The spermatozoa were placed into cryovials (Nunc, USA), cooled at a rate of 150 deg/min down to -80°C . Afterwards they were placed in liquid nitrogen. The cryovials were warmed in a water bath (37°C) for 10 minutes. The survival of sperm after thawing was determined using a hypoosmotic swelling test (HOS test). In addition, the sperm motility in the warmed samples was evaluated.

After cryopreservation (82.2 ± 8.9); (88 ± 9.9); (89.6 ± 8.6) and (92.1 ± 8.6)% of sperm survived; and (38.7 ± 6.8); (33.3 ± 6.9); (41.4 ± 8.1) and (78.8 ± 6.6)% were motile in groups 1–4, respectively. Despite a high survival rate of sperm in group 4, after the centrifugation and removal of CPA, the number of motile sperm decreased down to (27.3 ± 4.8)%.

Thus, the use of non-penetrating CPAs in various combinations enabled the sperm survival at a level of 60–80%. Cryopreservation of human sperm with extracellular CPAs (sucrose, PVP) is promising for ART, since spermatozoa can be used for fertilization of oocytes immediately after warming and without the removal of the cryoprotective medium.

