

Биофизические характеристики фолликулярной жидкости яичника человека до и после низкотемпературного консервирования

UDC 612.621.014.462:615.014.41

F.A. TODRIN¹, N.N. CHUB^{1*}, O.V. LIPINA¹, V.V. CHEKANOVA¹,
E.E. NIPOT¹, V.I. PINYAEV¹, P. TODOROV², O.A. GOROBCHENKO³**Biophysical Characteristics of Human Follicular Fluid Prior To and After Low Temperature Preservation**

В работе исследованы основные биофизические параметры фолликулярной жидкости человека до и после действия низких температур. Показано незначительное влияние криоконсервирования на осмотическое давление, pH, плотность фолликулярной жидкости и увеличение динамической вязкости криоконсервированной фолликулярной жидкости приблизительно на 40%.

Ключевые слова: фолликулярная жидкость, криоконсервирование.

У роботі досліджено головні біофізичні параметри фолікулярної рідини людини до та після дії низьких температур. Виявлено незначний вплив криоконсервування на осмолярність, рН, щільність фолікулярної рідини та збільшення динамічної в'язкості криоконсервованої фолікулярної рідини приблизно на 40%.

Ключові слова: фолікулярна рідина, криоконсервування.

In the work the basic biophysical parameters of human follicular fluid prior to and after cryopreservation have been investigated. It has been shown an insignificant effect of cryopreservation on osmotic pressure, pH and density of follicular fluid, and a dynamic viscosity of cryopreserved follicular fluid increases approximately by 40%.

Key-words: follicular fluid, cryopreservation.

Фолликулярная жидкость (ФЖ) – биологически активная среда яичников человека, которая играет важную роль в процессах фолликулогенеза, овуляции, созревания ооцита, транспорта и взаимодействия гамет [8]. В настоящее время при лечении бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) пациенткам проводится гормональная стимуляция овуляции. Использование высоких доз белковых и стероидных гормонов, а также низкотемпературное консервирование (НТК) могут влиять на физико-химические параметры ФЖ.

Цель работы – исследование влияния замораживания-оттаивания на биофизические характеристики фолликулярной жидкости яичника человека.

Материалы и методы

Фолликулярную жидкость получали в медицинском центре репродукции и генетики “Имплант” (г. Харьков) с согласия женщин, проходивших программу ЭКО. После аспирации фолликулов и помещения яйцеклеток в условия культивирования

ФЖ делили на 2 образца: первый (контрольный) исследовали в течение 3–6 ч после пункции фолликулов, второй – расфасовывали в пластиковые ампулы по 0,7–1,0 мл, маркировали и замораживали погружением в жидкий азот. Размораживали ФЖ на водяной бане (37°C) до образования жидкой фазы. Значение pH в образцах ФЖ, полученных из больших 16–22 мм (БФ) и малых 14–16 мм (МФ) фолликулов, измеряли на цифровом ионметре “pH-301” (Германия) при 20°C. Определяли буферную емкость в 20, 50 и 100% растворах ФЖ [4]. Осмотическое давление ФЖ (n=44) исследовали с помощью криоскопического метода на осмометре ОМКА-01 (Украина). Плотность ФЖ (n=6) измеряли в пикнометре (1мл) и вычисляли по формуле:

$$p = \frac{(m_2 - m) \times 0,99823}{m_1 - m},$$

где m – масса сухого пикнометра; m₁ – масса пикнометра с дистиллированной водой; m₂ – масса пикнометра с ФЖ (в граммах).

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

²Институт иммунологии репродукции БАН, г.София

³Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 373-31-19, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Institute for Immunology of Reproduction of Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

³V.N. Karazin Kharkov National University, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 3733119, fax: +380 57 373 3084, e-mail:cryo@online.kharkov.ua

Вязкость ФЖ определяли двумя способами, предварительно центрифугируя ее при 3000 об/мин 15 мин. При первом способе использовали капиллярно-рамочный вискозиметр типа Копли с капилляром длиной 98 мм и радиусом узкой части 0,38 мм, широкой – 0,78 мм при напряжении сдвига 2,85; 3,80; 5,70; 7,60; 9,50 дин/см² [7]. Для измерения вязкости вторым способом применяли специальный вискозиметр с шириной щели капилляра 0,8–0,9 мм, длиной – 2 мм, высотой 2–3,6 мкм [5].

Диэлектрическую проницаемость ФЖ измеряли на дифференциальном микроволновом диэлектрометре резонаторного типа [3] и рассчитывали по изменению частоты резонатора по формулам Дебая [2]. Для определения изменений диэлектрической проницаемости Δε эталоном была дистиллированная вода. Относительная ошибка измерений составляла 0,1%.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критерия Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

Известно, что в яичниках при фолликулогенезе осмотическое давление ФЖ связано с локальными регуляторными механизмами осмоса. При росте фолликула происходят многочисленные химические преобразования, вследствие чего внутри фолликулярных клеток повышается осмотическое давление, и ток жидкости направлен из крови через клетки гранулезы в ФЖ [9]. Установлено, что осмолярность ФЖ, полученной из МФ, была достоверно ниже, чем в ФЖ из БФ (табл. 1). Следует отметить значительную индивидуальную вариабельность данного показателя (от 245 до 305 мОсм),

Таблица 2. Динамическая вязкость (измерение первым способом) ФЖ до и после НТК

Условия эксперимента	Напряжение сдвига, дин/см ²				
	2,85	3,80	5,70	7,60	9,50
	Вязкость, сП				
ФЖ из БФ до НТК (n = 14)	4,4±0,11	3,40±0,21	3,02±0,20	2,42±0,19	2,22±0,05
ФЖ из БФ после НТК	4,4±0,18	3,3±0,12	3,00±0,18	2,38±0,21	2,02±0,04
ФЖ из МФ до НТК (n = 9)	4,8±0,22	3,32±0,18	3,04±0,22	2,9±0,15	2,54±0,12
ФЖ из МФ после НТК	4,8±0,22*	3,38±0,20	3,04±0,20	2,8±0,20	2,59±0,20

Примечание: * – различия достоверны при сравнении с данными для БФ, p<0,05.

Таблица 1. Биофизические параметры ФЖ до и после НТК

Исследуемые параметры	Нативная ФЖ		Деконсервированная ФЖ	
	МФ	БФ	МФ	БФ
pH	8,071±0,02	8,182±0,05	8,156±0,04	8,269±0,08
Плотность, кг/м ³	1021 – 1022		1021 – 1022	
Осмолярность, мОсм	278,5±7,7*	293,7±7,2	270,5±5,5*	283,7±7,1

Примечание: * – различия достоверны при сравнении с данными для БФ, p<0,05.

на который, по-видимому влияют, принимаемые пациенткой в программе ЭКО гормональные белковые препараты. После криоконсервирования осмотическое давление ФЖ снижалось независимо от величины фолликулов.

При исследовании pH и плотности ФЖ было показано, что криоконсервирование не влияет на данные показатели (табл. 1). Поддержка pH внутренних сред организма осуществляется с помощью физиологических и физико-химических механизмов компенсации через буферные системы – кровь, плазму и другие биологические жидкости, которые характеризуются буферной емкостью [4]. Буферная ёмкость ФЖ составляла 0,6 моль/л, что сопоставимо с буферной емкостью плазмы крови [4]. Однако в наших исследованиях значение pH нативной ФЖ значительно выше, чем установлено ранее [8]. По-видимому, данный факт связан со стимуляцией овуляции в программе ЭКО, что необходимо учитывать при культивировании ооцитов человека.

При измерении динамической вязкости первым способом до и после замораживания была отмечена тенденция к ее увеличению в ФЖ, полученной из МФ, и зависела от напряжения сдвига (табл. 2).

При измерении вторым способом вязкость ФЖ, аспирированной из МФ, была достоверно выше, чем из БФ. После криоконсервирования вязкость ФЖ увеличивалась примерно на 40% независимо от величины фолликулов (табл. 3). Значительное повышение вязкости после замораживания-оттаивания ФЖ, по-видимому, связано с появлением белковых агрегатов [6].

При исследовании диэлектрической проницаемости ФЖ было показано, что Δε ФЖ, выделенной из МФ,

Таблица 3. Вязкость (измерение вторым способом) ФЖ яичника человека до и после НТК

Условия эксперимента	Вязкость, сП	
	до НТК	после НТК
ФЖ из БФ (n=8)	1,89±0,23	2,63±0,36 ²
ФЖ из МФ (n=7)	2,31±0,29 ¹	3,3±0,38 ^{1,2}

Примечания: ¹ – различия достоверны при сравнении с данными для БФ, $p < 0,05$; ² – различия достоверны при сравнении с данными до НТК, $p < 0,05$.

достоверно выше, чем в ФЖ, полученной из БФ, однако замораживание-оттаивание незначительно повышало $\Delta\epsilon$ (4%). Увеличение $\Delta\epsilon$ позволяет предположить, что полученный эффект связан с различным белковым и гормональным составом ФЖ, полученной из разных фолликулов, и конформационными изменениями макромолекул в результате действия низких температур. Аналогичную зависимость $\Delta\epsilon$ после НТК наблюдали при исследовании сыворотки кордовой крови человека [1].

Выводы

Замораживание ФЖ путем погружения в жидкий азот незначительно влияло на ее биофизические характеристики, однако зависело от величины фолликулов.

Литература

1. Горобченко О.А., Мошко Ю.А., Николов О.Т. и др. Влияние режимов замораживания на диэлектрические свойства сыворотки кордовой крови // Пробл. криобиологии.– 2004.– №2.– С. 4–10.
2. Дебай П. Полярные молекулы.– М., 1931.– 245 с.
3. Николаев О.Т., Жиликов Т.А. Измерение комплексной диэлектрической проницаемости жидких диэлектриков с большими потерями // Журн. физ. химии.– 1991.– Т. 65, №5.– С. 1312–1316.
4. Садовнича Л.П., Хухрянский В.Г., Цыганенко А.Я. Биофизическая химия.– Киев, 1986.– 68 с.
5. Тодрин А.Ф. Влияние гематокрита на вязкость суспензии эритроцитов в капиллярном вискозиметре при малых размерах капилляров // Пробл. криобиологии.– 2005.– Т. 15, №1.– С. 14–16.
6. Chan T., Jafrin M.Y., Seshardi V., McKay C. Flow of red blood cell suspensions through narrow two-dimensional channels // Biorheology.– 1982.– Vol. 19, N1-2.– P. 253–267.
7. Copley A.I., Scott G.W., Glover F.A., Thorley R.S. Capillary flow and wall adherence of bovine blood, plasme and serum in contact with glass and fibril surfacel // Kolloid Zeitschrift.– 1960.– Vol. 68, N2.– P. 101–107.
8. Edwards R.G. Follicular fluid // J. Reprod. Fertil.– 1974.– Vol. 37, N1.– P. 189–219.
9. Intragonal regulation of reproduction / Ed. by P. Franchimont, C.P. Channing.– London: Academic Press, 1981.– 210 p.

Поступила 07.07.08