

Влияние экзоцеллюлярных криопротекторов на подвижность спермиев человека

В.И. Грищенко, А.А. Гапон, Н.Н. Чуб, М.И. Крамар, В.Л. Родионова

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Exocellular Cryoprotectants on Human Spermatozoa Motility

V.I. GRISCHENKO, A.A. GAPON, N.N. CHUB, M.I. KRAMAR, V.L. RODIONOVA

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

Состав криозащитной среды является одним из основных факторов, определяющих эффективность низкотемпературного консервирования.

Полиэтиленоксиды (ПЭО) представляют класс малотоксичных, не проникающих через плазматическую мембрану клеток веществ. В качестве криопротекторов полиэтиленоксиды различной молекулярной массы были успешно применены при разработке методов криоконсервирования эритроцитов, овариальной ткани и других биообъектов человека и млекопитающих. Цель работы – изучение влияния ПЭО-400, 1500, 2000, 3000 на подвижность спермиев человека на этапах низкотемпературного консервирования.

Материалом исследования служили эякуляты, полученные у мужчин с нормозооспермией в возрасте от 20 до 40 лет после 3-4-дневной половой абстиненции. Концентрацию и подвижность спермиев оценивали согласно рекомендациям ВОЗ. Спермий с быстрым и медленным поступательным прямолинейным движением относили к группе “а+в”. Были использованы 5 и 10 % концентрации ПЭО-400, 1500, 2000, 3000 (х. ч.) на растворе Хэнкса. Контролем служила криозащитная смесь глюкоза-лактат-желток (ГЛЖ). После эквипирации с криозащитной средой (1:1) в течение 15, 30 и 60 мин образцы спермы оценивали и криоконсервировали по трехэтапной программе: 1-й – охлаждение со скоростью 1–2°C/мин до 10°C в ультратермостате в условиях холодильника; 2-й – со скоростью 50–60°C/мин до –70...–75°C; 3-й – погружение в жидкий азот. Размораживали препараты на водяной бане при 40°C до появления жидкой фазы. При статистической обработке использовали критерий Стьюдента-Фишера.

При оценке нативных эякулятов концентрация спермиев в 1 мл составляла 68±6,8 млн, после добавления криопротекторов – 37±2,8 млн, после криоконсервирования – 30±2,8 млн. При сравнительном изучении подвижности спермиев было отмечено достоверное снижение концентрации гамет во фракции “а+в” через 60 мин эквипирации с ними, что косвенно может свидетельствовать о достаточно низком цитотоксическом действии изучаемых криозащитных сред на спермин человека. Было обнаружено стимулирующее действие ПЭО-2000 и ПЭО-3000 на подвижность спермиев человека, по-видимому, за счет связывания свободной воды в эякуляте. Однако после криоконсервирования спермы под защитой ПЭО с различной концентрацией и молекулярной массой отмечали достоверное снижение подвижности спермиев человека по сравнению с ГЛЖ.

Таким образом, ПЭО-400, 1500, 2000, 3000 не обладают криопротекторными свойствами для спермиев человека, несмотря на их низкую цитотоксичность.

Cryoprotective medium composition is one of the main factors, determining the efficiency of low temperature preservation.

Polyethylene oxides (PEO) are the class of low-toxic substances, non-penetrating through cell plasmatic membrane. Polyethylene oxides with different molecular mass were successfully applied as cryoprotectants when designing the cryopreservation methods for erythrocytes, ovarian tissue and other human and mammalian bioobjects. The research was aimed to study the effect of PEO-400, 1500, 2000, 3000 on human spermatozoa motility under low temperature preservation stages.

The ejaculates, procured in men with normozoospermia aged from 20 to 40 years after 3-4 days of sexual abstinence, served as the research material. Spermatozoa concentration and motility were estimated according to the WHO recommendations. Spermatozoa with rapid and slow progressive linear movements were referred to the “a+b” group. We used 5 and 10% concentrated PEO-400, 1500, 2000, 3000 (chemically pure grade) with Hank’s solution. The glucose-lactate-yolk (GLY) cryoprotective mixture served as the control. After equilibration with cryoprotective medium (1:1) for 15, 30 and 60 min the sperm samples were assessed and cryopreserved by a three-step program: the 1st consisted in cooling down to 10°C with 1-2°C/min rate in ultrathermostat under refrigerator condition; that with 50–60°C/min rate down to –70...–75°C was in the 2nd one; the 3rd one comprised the immersion into liquid nitrogen. Preparation were thawed on water bath at 40°C up to liquid phase appearance. The results were statistically processes using the Student-Fisher criterion.

When estimating the native ejaculates the spermatozoa concentration in 1 ml was 68±6.8 mln, 37±2.8 mln after cryoprotectant adding and 30±2.8 mln after cryopreservation. Under comparative study of spermatozoa motility a statistically significant decrease in gamete concentrations in “a+b” fraction 60 min after equilibration with them was noted, that might testify to quite a low cytotoxic effect of studied cryoprotective media on human spermatozoa. There was found-out a stimulating effect of PEO-2000 and PEO-3000 on human spermatozoa motility apparently due to a free water binding in ejaculate. However after sperm cryopreservation under PEO protection with different concentration and molecular mass there was observed a statistically significant decrease in human spermatozoa motility compared to the GLY.

Thus, PEO-400, 1500, 2000, 3000 have no cryoprotective properties for human spermatozoa, in spite of their low cytotoxicity.