



ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние трегалозы на сохранность мембран, подвижность и фрагментацию хроматина эпидидимальных сперматозоидов мышей при гипотермическом хранении в безэлектролитных средах**Д.А. Исаев¹, М.Ю. Мартынова¹, И.В. Володяев², А.О. Ревякин³**

¹ – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства», Московская область

² – Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

³ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

Контактная информация: к.б.н. Исаев Дмитрий Александрович, isaev@hotmail.ru

В работе представлены данные о гипотермическом хранении без замораживания эпидидимальных сперматозоидов мышей линии C57BL/6 в двух безэлектролитных консервантах на основе глюкозы и альбумина, один из которых содержал 50 мМ трегалозы. Трегалоза в составе консерванта значительно снижала относительное количество сперматозоидов с поврежденными мембранами после 14-ти суток хранения по сравнению с консервантом без трегалозы ($1,4 \pm 0,4\%$ и $8,2 \pm 1,2\%$ соответственно; $p=0,00$; $N=16$). В то же время, для обоих консервантов не установлены различия по способности сперматозоидов восстанавливать подвижность после хранения ($p=0,57$; $N=16$), а также по фрагментации хроматина ($p=0,69$; $N=12$). Эти наблюдения могут быть полезными при оптимизации методики гипотермического хранения спермы человека в репродуктивной медицине.

Ключевые слова: гипотермическое хранение спермы, безэлектролитная среда, трегалоза.

Введение

Гипотермическое хранение спермы без замораживания является альтернативой криоконсервации в случаях, когда длительное хранение не требуется, либо при отсутствии возможности глубокой заморозки. Независимость от криогенного оборудования и источника жидкого азота делает безопасной и удобной тран-

спортировку спермы. В репродуктивной медицине гипотермическое хранение спермы дает возможность пациенту-мужчине не присутствовать в день проведения процедуры экстракорпорального оплодотворения или внутриматочной инсеминации [1, 4].

В настоящее время технологии гипотермического хранения позволяют

поддерживать фертильность спермы в течение нескольких дней. Наиболее эффективным, очевидно, является предложенный группой исследователей Университета Йокогамы в конце 90-х гг. XX века способ хранения спермы при +4°C в т.н. безэлектролитной среде EFM, представляющей собой 0,32 М водный раствор глюкозы и 3% бычьего сывороточного альбумина (БСА) [16]. Этот подход позволяет сохранять фертильность спермы человека и мыши в течение, как минимум, двух недель [1, 8, 12-14]. Более высокая безопасность по сравнению с криоконсервацией и возможность применения этого метода в репродуктивной медицине убедительно продемонстрированы в работах [4, 15].

Существенным недостатком использования среды EFM является осмотический стресс, который клетки переживают в процессе консервации и ревитализации, и который приводит к поражению мембран сперматозоидов. Это усложняет методику, требуя постепенной медленной замены сред [1, 4] или применения для обработки спермы специального градиента на основе EFM [14, 17].

Известно, что невосстанавливающий дисахарид трегалоза, используемый в качестве криопротектора, способствует поддержанию целостности мембран сперматозоидов при осмотических перепадах [5]. Проведенные нами эксперименты показали, что трегалоза способствует лучшей сохранности мембран при гипотермическом хранении спермы осетровых рыб [3, 4]. Кроме того, трегалоза в качестве «осмотического буфера» позволяет добавлять консервант к суспензии клеток быстро и так же быстро заменять консервант на среду при ревитализации.

Целью нашей работы являлась оптимизация метода гипотермического хранения спермы путем введения трегалозы в состав безэлектролитной среды.

Материалы и методы

Эксперименты проводили в соответствии с этическими нормами и рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes, ETS №123, Strasbourg, 1986). Протокол эксперимента одобрен биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

В исследовании использовано 16 самцов мышей линии C57BL/6 в возрасте 6-8 недель массой 18-22 г. Эвтаназию мышей осуществляли путем цервикальной дислокации под эфирным наркозом. Сперматозоиды выделяли из *cauda epididymidis* и прилежащего фрагмента *vas deferens* в каплях DPBS без $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.

Каждый из 16-ти образцов спермы был разделен на 2 пробы по 25 мкл для гипотермического хранения в двух консервантах – безэлектролитной среде EFM [16] и консерванте ISGT, состоящем из 0,270 М глюкозы, 0,05 М трегалозы, 3% БСА и деионизованной воды. Пробы были помещены в пробирки типа Эппендорф в 500 мкл соответствующего консерванта и хранились в течение 14-ти суток при +4°C.

Для ревитализации спермы после гипотермического хранения отделяли консервант центрифугированием, ресуспендировали осадок в среде Menezo B2 и инкубировали в течение 30 мин при +37°C.

Подвижность спермы оценивали непосредственно после получения и после 14-ти суток гипотермического хранения путем подсчета сперматозоидов с поступательным движением. Для оценки повреждений мембран выполняли суправитальный тест с эозином. Анализ фрагментации хроматина до и после гипотермического хранения выполняли методом SCD-test [7], сперматозоиды с фрагментированной ДНК определяли по отсутствию окрашенного гало. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее, m – стандартная ошибка среднего.

Оценку различий в подвижности, фрагментации хроматина и повреждении мембран после хранения в двух консервантах проводили по парному Т-критерию Вилкоксона. Для выявления связи между показателями применяли непараметрический корреляционный

анализ Спирмена. Расчеты и подготовку иллюстративного материала выполняли с использованием пакета программ Statistica 5.0 (StatSoft, Inc.).

Результаты и их обсуждение

Подвижность сперматозоидов

Исходная подвижность эпидидимальных сперматозоидов после выделения и инкубирования в течение 30 мин составила $43,6 \pm 2,9\%$ ($N=12$). Для 4-х образцов исходная оценка подвижности не проводилась. После 14-ти суток гипотермического хранения в средах EFM и ISGT и последующей ревитализации подвижность составила $31,1 \pm 2,5\%$ и $30,6 \pm 2,6\%$ ($N=16$) соответственно (рис. 1). Достоверных различий по восстановлению подвижности после гипотермического хранения в двух консервантах не выявлено ($T=50$, $N=16$, $p=0,57$).

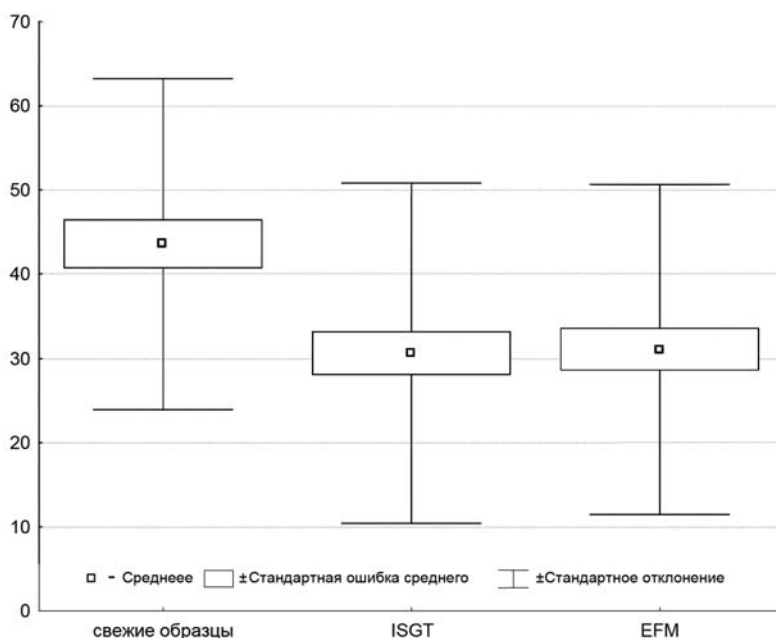


Рис. 1. Подвижность сперматозоидов мышей в свежих образцах и спустя 14 суток гипотермического хранения в консервантах ISGT и EFM.

Выявлена сильная положительная корреляция между исходной подвижностью спермы и подвижностью после хранения – как в EFM, так и в ISGT (для обоих консервантов $R=0,94$; $N=12$; $p=0,00$). Эти данные показывают, что способность к восстановлению подвижности, которая прогрессивно снижается в процессе хранения, зависит от исходного качества спермы.

S. Quan и соавт. [12] хранили эпидидимальную сперму гибридных мышей B6C3F1 в EFM в течение 14-ти суток. Предварительную обработку спермы проводили путем центрифугирования в градиенте Percoll, который удаляет большую часть неподвижных сперматозоидов, поэтому начальная подвижность спермы составляла около 70%. Спустя 14 суток гипотермического хранения в EFM до 15% сперматозоидов восстанавливали подвижность, но прогрессивно-подвижных сперматозоидов

при этом авторы не наблюдали. Способность спермы к оплодотворению снижалась в процессе хранения, и через 7 суток частота оплодотворения составила немногим более 50%, при этом лишь единичные эмбрионы (0,3%) развились до стадии бластоцисты [12].

В нашем исследовании подвижность восстанавливали около 30% сперматозоидов, при этом, в отличие от данных [12], подавляющее большинство подвижных сперматозоидов были определены нами как прогрессивно-подвижные (сперматозоиды с редкими колебательными движениями на месте при подсчете не учитывались). Возможно, использованный нами протокол консервации, который не исключает полностью присутствия ионов электролитов (Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} , Cl^{-} , бикарбонат), а лишь снижает их концентрацию в 40-50 раз, способствует лучшей сохранности подвижности.

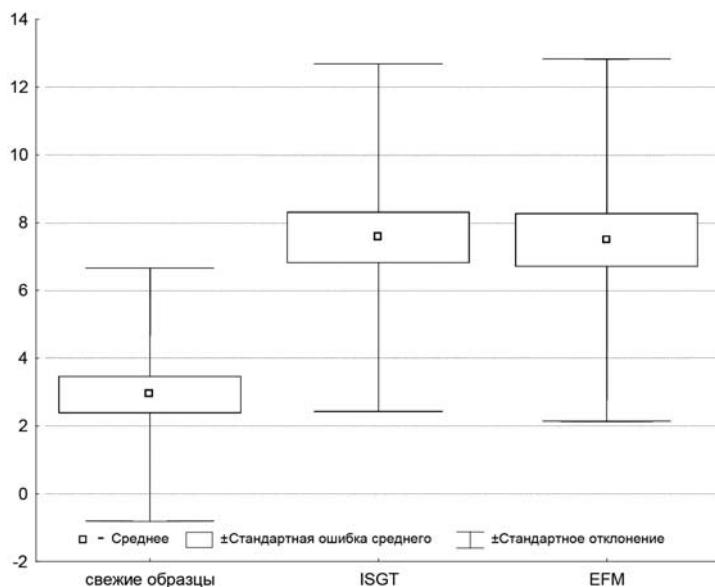


Рис. 2. Фрагментация хроматина в сперматозоидах мышей – индекс SDF (%) в свежих образцах и спустя 14 суток гипотермического хранения в консервантах ISGT и EFM.

Фрагментация хроматина

Индекс SDF, определенный в свежих образцах, составил $2,9 \pm 0,6\%$ ($N=12$). Спустя 14 суток хранения в EFM и ISGT индекс SDF составил соответственно $7,5 \pm 0,8\%$ и $7,6 \pm 0,8\%$ ($N=12$) (рис. 2). Достоверных различий по восстановлению подвижности после гипотермического хранения в двух консервантах не выявлено ($T=34$; $N=12$; $p=0,69$). Установлена корреляция между исходным индексом SDF и фрагментацией хроматина после хранения в EFM и ISGT ($R=0,76$, $N=12$, $p=0,04$ для EFM; $R=0,78$, $N=12$, $p=0,03$ – для ISGT).

Pérez-Cerezales и соавт. изучали фрагментацию ДНК в сперматозоидах мыши из *caput epididymidis* и *cauda epididymidis* методами TUNEL, comet assay, SCSA и SCD-test [11]. SCD-test был выполнен с использованием коммерческих наборов SPERM-HALOMAX-Mus-FF kit. Отличием этого протокола от примененного нами протокола [7] является отсутствие стадии денатурирующей обработки: таким образом, сперматозоиды с гало считаются носителями фрагментированной ДНК. TUNEL и SCD-test не выявили различий между фрагментацией ДНК в головке и хвосте эпидидимиса (не более 4%). По данным comet assay, в головке эпидидимиса $8,1 \pm 0,7\%$ и в хвосте эпидидимиса $5,5 \pm 0,3\%$ сперматозоидов с фрагментированной ДНК, различия достоверны. По данным SCSA, в головке $16,2 \pm 4,6\%$ и в хвосте $5,8 \pm 1,0\%$ сперматозоидов с фрагментированной ДНК, различия также достоверны. Методы comet assay и SCSA, по заключению авторов, более чувствительны по сравнению с TUNEL и SCD-test [11].

По данным С. Yildiz и соавт. [20], фрагментация ДНК эпидидимальной

спермы мышей линии C57BL/6, определенная методом SCSA, составляла $3,2 \pm 0,7\%$ ($N=8$). Частота фертилизации *in vitro* такой спермой была 68,3%, а до стадии бластоцисты развилось 78,3% эмбрионов. После криоконсервации в оптимально подобранном консерванте фрагментация ДНК для сперматозоидов мышей линии C57BL/6 составила $17,4 \pm 2,8\%$, при этом частота фертилизации была 38,7%, а до бластоцисты развились 40,2% эмбрионов [20]. Очевидно, что фрагментация ДНК, наряду с прочими факторами, является причиной снижения фертильности спермы и способности к нормальному доимплантационному развитию в условиях эксперимента *in vitro*. Тем не менее, такая сперма может считаться фертильной, а более высокая частота фертилизации может быть достигнута путем дополнительной обработки (сепарации) спермы.

Таким образом, полученные нами данные, с учетом чувствительности метода SCD-test и различия в протоколах, соответствуют аналогичным данным работы [11], а полученные значения SDF после двух недель гипотермического хранения соответствуют потенциально фертильной сперме [20].

Повреждения мембран

Относительное количество клеток с поврежденными мембранами после 14-ти суток хранения в EFM составило $8,2 \pm 1,2\%$, в ISGT – $1,4 \pm 0,4\%$ ($N=16$) (рис. 3). Эти различия достоверны ($T=0$; $N=16$; $p=0,00$) и явно указывают на лучшую сохранность мембран в консерванте с трегалозой. Примечательно, что не установлена корреляция между исходной подвижностью и повреждением мембран в процессе хранения как в среде EFM ($p=0,05$), так и в среде ISGT

($p=0,11$). В то же время, повреждения мембран в обоих консервантах коррелируют с SDF как свежих образцов ($R=0,85$ для EFM и $R=0,79$ для ISGT; $N=12$; $p=0,00$), так и с SDF после 14-ти суток хранения ($R=0,69$ для EFM, $p=0,01$; $R=0,59$ для ISGT, $p=0,04$; $N=12$). Повреждения мембран, как и фрагментированная ДНК, очевидно, являются атрибутами погибших клеток, присутствие которых значительно влияет на результаты, однако необходимо отметить, что для среды ISGT эта корреляция ниже, чем для EFM.

В упомянутой выше работе [20] после размораживания спермы мышей линии C57BL/6 лишь $28,6 \pm 2,1\%$ ($N=15$) сперматозоидов сохранили intactные мембраны. Авторы определяли повреждения мембран путем двойного флуоресцентного окрашивания йодистым пропидием (PI) и красителем SYBR-14

[18]. Мы применяли суправитальное окрашивание эозином, которое, по заключению L.F. Brito и соавт. [6], дает завышенную оценку числа сперматозоидов с intactными мембранами по сравнению с флуоресцентной окраской SYBR-14/PI. A. Wysokińska и S. Kondracki [19] применяли оба этих метода в исследовании со спермой хряков. Принимая во внимание сходные результаты других исследователей, авторы делают вывод о достаточной эффективности «классического» метода окраски эозином/нигрозином на основании высокой положительной корреляции между результатами двух методов [19].

Свойство трегалозы поддерживать сохранность клеточных мембран при осмотических перепадах успешно используется при криоконсервации спермы позвоночных [5], а также при хранении спермы в обезвоженном состоянии

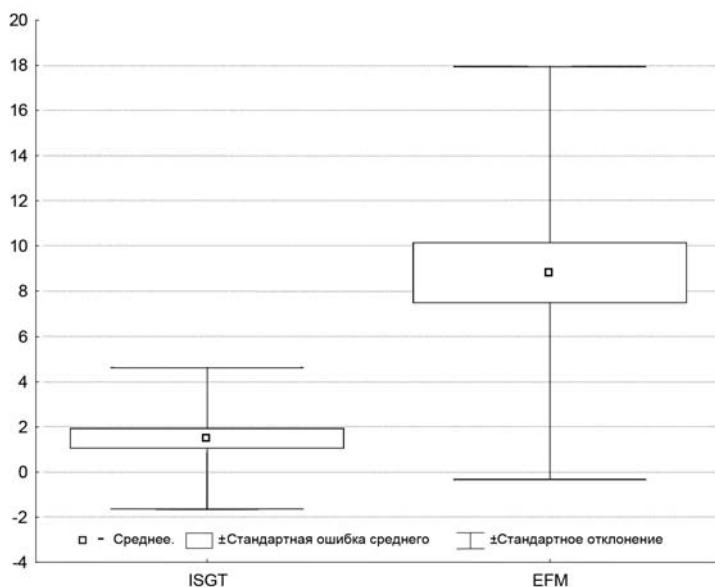


Рис. 3. Относительное количество (%) сперматозоидов с поврежденными мембранами спустя 14 суток гипотермического хранения в консервантах ISGT и EFM.

без замораживания [9, 10]. Полагая, что снижение жизнеспособности спермы при гипотермическом хранении в значительной мере связано с повреждениями мембран, как в процессе хранения, так и в ходе осмотических перепадов при манипуляциях [1], мы ввели в состав безэлектролитного консерванта трегалозу путем частичной замены глюкозы. Снижение концентрации глюкозы до 270 мМ, а также добавление «осмотического буфера» – трегалозы – позволило быстро разбавлять сперму консервантом и так же быстро заменять консервант на культуральную среду при ревитализации. Не исключено, что такое упрощение методики и сокращение времени манипуляций дополнительно способствуют лучшей сохранности спермы.

Заключение

Настоящее исследование с использованием эпидидимальных сперматозоидов мыши показало, что введение трегалозы в состав безэлектролитного раствора для гипотермического хранения значительно улучшает сохранность клеточных мембран, не оказывая видимого влияния на способность к восстановлению подвижности и фрагментацию хроматина. Мы не проводили исследования фертильности сперматозоидов, а также теста на связывания с гиалуронатом или способности дезагрегировать кумулюс, тем не менее, низкий уровень фрагментации ДНК и относительно высокая способность к восстановлению подвижности (с учетом исходной подвижности) соответствуют фертильной сперме и свидетельствуют о репродуктивной безопасности метода. Таким образом, результаты данного исследования могут быть использова-

ны при разработке и/или оптимизации технологий гипотермического хранения спермы человека в репродуктивной медицине.

Список литературы

1. *Исаев Д.А., Заева В.В., Бакурадзе Р.В. и др.* Хранение спермы человека в течение 2 недель без замораживания // Проблемы репродукции. 2009. V. 5. P. 33-35.
2. *Исаев Д.А., Мартынова М.Ю., Шишанова Е.И. и др.* Гипотермическое хранение спермы осетровых рыб в изотонических растворах // Рыбоводство и рыбное хозяйство. 2013. № 10. С. 41-49.
3. *Исаев Д.А.* Гипотермическое хранение спермы стерляди в консервантах на основе трегалозы: предварительное исследование // В сб.: «Перспективы и проблемы развития аквакультуры в составе АПК»: Материалы Всероссийской научно-практической конференции (Москва, ВВЦ, 4-6 февраля 2014 г.) / ГНУ ВНИИР. - М.: Перо, 2014. С. 131-137.
4. *Исаев Д.А., Захарова Е.Е., Капралова И.В. и др.* Краткосрочное хранение спермы без замораживания в программах ЭКО/ИКСИ // Проблемы репродукции. 2015. № 4. С.65-70.
5. *Ahmad E., Aksoy M.* Trehalose as a cryoprotective agent for the sperm cells: a mini review // Animal health, prod. and hyg. 2012. V. 1. P. 123-129.
6. *Brito L.F., Barth A.D., Bilodeau-Goeseels S., et al.* Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate // Theriogenology. 2003. V. 60. P. 1539-1551.
7. *Fernández J.L., Muriel L., Rivero M.T., et al.* The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation // J. Androl. 2003. V. 24. P. 59-66.
8. *Kanno H., Saito K., Ogawa T., et al.* Viability and function of human sperm in electrolyte-free cold preservation // Fertil. steril. 1998. V. 69. P. 127-131.
9. *Keskintepe L., Eroglu A.* Freeze-drying of mammalian sperm // Methods mol. biol. 2015. V. 1257. P. 489-497.
10. *McGinnis L.K., Zhu L., Lawitts J.A., et al.* Mouse sperm desiccated and stored in trehalose

- medium without freezing // Biol. reprod. 2005. V. 73. P. 627-633.
11. *Pérez-Cereales S., Miranda A., Gutiérrez-Adán A.* Comparison of four methods to evaluate sperm DNA integrity between mouse caput and cauda epididymidis // Asian J. Androl. 2012. V. 14. P. 335-337.
 12. *Quan S., Yamano S., Nakasaka H., et al.* Effects of preservation of mouse spermatozoa in electrolyte-free solution at 4 degrees C on the outcome of mouse in vitro fertilization // J. Assist. reprod. genet. 2000. V. 17. P. 388-392.
 13. *Quan S., Zhou H.K., Shuji Y., et al.* Fertilizing capacity of human sperm preserved in cold electrolyte-free solution // Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao. 2002. V. 22. P. 928-930.
 14. *Riel J.M., Huang T.T., Ward M.A.* Freezing-free preservation of human spermatozoa – a pilot study // Arch. Androl. 2007. V. 53. P. 275-284.
 15. *Riel J.M., Yamauchi Y., Huang T.T., et al.* Short-term storage of human spermatozoa in electrolyte-free medium without freezing maintains sperm chromatin integrity better than cryopreservation // Biol. reprod. 2011. V. 85. P. 536-547.
 16. *Saito K., Kinoshita Y., Kanno H., et al.* A new method of the electrolyte-free long-term preservation of human sperm at 4 °C // Fertil. steril. 1996. V. 65. P. 1210-1213.
 17. *Saito K., Kinoshita Y., Yumura Y., et al.* Effects of extracellular ions on the reactivation of human spermatozoa preserved in electrolyte-free solution // Andrologia. 1999. V. 31. P. 211-215.
 18. *Songsasen N., Leibo S.P.* Cryopreservation of mouse spermatozoa. I. Effect of seeding on fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa // Cryobiology. 1997. V. 35. P. 240-254.
 19. *Wysokińska A., Kondracki S.* Assessment of changes in sperm cell membrane integrity occurring during the storage of semen from genetically different males using two diagnostic methods // Canadian J. of animal science. 2014. V. 94. P. 601-606.
 20. *Yildiz C., Ottaviani P., Law N., et al.* Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the mouse // Reproduction. 2007. V. 133. P. 585-595.

Effect of trehalose on the safety membrane, motility and epididymal sperm chromatin fragmentation mice during hypothermic storage in electrolyte-free buffer

D.A. Isaev, M.Yu. Martynova, I.V. Volodyaev, A.O. Revyakin

This work presents data on hypothermic storage without freezing of epididymal sperm of C57BL/6 mice in two electrolyte-free preservative buffers based on glucose and albumin, one of them supplied with 50 mM trehalose. The adding of trehalose in preservative buffer brought down significantly percentage of spermatozoa with damaged membrane after 14 days of storage as compared to solution without trehalose ($1.4 \pm 0.4\%$ vs $8.2 \pm 1.2\%$; $p=0.00$; $N=16$). At the same time, there were no differences between two buffers in the ability of sperm to regain motility after storage ($p=0.57$; $N=16$) as well in the chromatin fragmentation ($p=0.69$; $N=12$). Our findings might be useful for optimization of hypothermic storage protocol for human sperm in reproductive medicine.

Key words: hypothermic sperm storage, electrolyte-free buffer, trehalose.