

МОДИФИКАЦИЯ КРИОПРОТЕКТОРНОЙ СРЕДЫ КОМПОНЕНТАМИ ЯИЧНОГО ЖЕЛТКА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ВЫЖИВАЕМОСТИ СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Смоленцева Д.А.¹, Миронова А.Г.², Сыбачин А.В.¹, Афанасьева С.И.¹, Симоненко Е.Ю.¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: ksimonenko@inbox.ru

² Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ

Поступила в редакцию: 07.07.2020

Аннотация. Криоконсервация – современный удобный метод хранения биологического материала. Однако криоконсервация может приводить и к нежелательным явлениям, вызванным повреждением биологического материала. Для защиты клеток от повреждения используют криопротекторные среды, включающие проникающие в клетку компоненты (глицерин, ДМСО) и непроникающие (дисахара, белки). К непроникающим компонентам относится яичный желток. Ранее в наших работах было показано, что модификация криопротектантов суспензией яичного желтка – один из наиболее эффективных методов улучшения выживаемости сперматозоидов. В связи со сложностью использования соединений животного происхождения для клеток человека, в работе представлено исследование модификации базового (коммерческого) криопротектора SpermFreeze компонентами желтка: лецитином и холестерином. Проведены тесты на цитотоксичность для различных растворителей холестерина, подобраны концентрации всех компонент, определены изменения индекса подвижности сперматозоидов после заморозки-разморозки во всех исследуемых модификациях криопротекторной среды. В работе проведено сравнение методов измерения концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов для выбора оптимального протокола. Также в работе показано, что модификация базового криопротектора комплексами циклодекстрин-холестерин повышает выживаемость сперматозоидов на 13% и так же эффективно, как с добавлением суспензии яичного желтка; добавление лецитина значительно повышает эффективность базового криопротектора.

Ключевые слова: криопротектор, яичный желток, лецитин, холестерин, подвижность сперматозоидов, ВРТ

В современной медицине и биологии всё более широкое применение находят методы работы с клетками, связанные с низкими температурами, такие как криохирургия, криофиксация, криоконсервация. Метод криоконсервации активно используется для сохранения плазмы крови, пуповинной крови, стволовых клеток [1,2]. Так, криобанки спермы, яйцеклеток, предимплантационных эмбрионов, яичниковой ткани являясь неотъемлемой частью вспомогательных репродуктивных технологий. Однако криоконсервация также приводит и к нежелательным явлениям, вызванным повреждением биологического материала. Подвижность и оплодотворяющая способность сперматозоидов после криоконсервации уменьшается в среднем на 30-70%, еще сложнее сохранить одиночные клетки. [1]. Такая широкая изменчивость выживаемости определяется функцией плазматических мембран: их пластичностью, состоянием ферментных систем, способностью выдерживать деформационные напряжения, возникающие при фазовых переходах лед–вода. Для защиты клеток при криоконсервации используют специальные вещества – криопротекторы: проникающие (глицерин, этиленгликоль, диметилсульфоксид (ДМСО), пропиленгликоль) и непроникающие (сахароза, трегалоза, высокомолекулярные соединения, белки, поливинил алкогаль и др.). Для снижения цитотоксичности криопротекторные среды, как правило, представляют собой комбинацию проникающих и непроникающих компонент. Известно, что глицерин, наносит наименьшее повреждение клеткам, в сравнении с другими соединениями [2]. Поэтому многие коммерческие среды для заморозки биологического материала разработаны на основе глицерина. Добавление яичного желтка в культуру клеток снижает интенсивность осмотических процессов за счет создания на поверхности клеток гидрофобной фазы из липоидных компонентов [3]. Ранее в наших работах был разработан протокол эффективной модификации базовой криопротекторной среды эмульсией желтка (в концентрации 5,6 мг/мл). Нами было показано, что присутствие эмульсии желтка в криопротекторе увеличивает долю жизнеспособных клеток на 10-12% и снижает дефекты плазматических мембран после криоконсервации на 5-15% по сравнению с коммерчески доступными аналогами [4, 5]. Однако применение желтка, имеющего животное происхождение, для криоконсервации клеток человека в клинической практике затруднено. Поскольку механизмы криопротекторного действия яичного желтка связаны с влиянием фосфатидилхолина и холестерина на параметры плазматических мембран, нами была проведена оценка минимальной концентрации холестерина во внешней среде необходимой для равновесного состояния содержания холестерина в плазматической мембране ($3,3 \cdot 10^{-2}$ нмоль/мл) [4]. Концентрация холестерина в разработанном нами протоколе модификации криопротектора эмульсией желтка составляла 224 нмоль/мл. Известно, что встраивание холестерина в клеточные мембраны обеспечивает их стабильность и достаточно высокую подвижность в широком диапазоне температур 5-70°C, приводит к стабилизации гексагональной фазы

(Ип). [6, 7]. Увеличение концентрации холестерина в жидкокристаллической структуре мембраны приводит к увеличению пластичности мембран во время фазовых переходов, что определяет их устойчивость к повреждениям при деформациях во время криоконсервации. Так, была обнаружена строгая корреляция молярного процента холестерина с криотолерантностью сперматозоидов разных видов млекопитающих [8]. В связи с этим, интересен вопрос об эффективности модификации криопротекторных сред компонентами яичного желтка – холестерином и фосфатидилхолином, а также способах их разведения.

В настоящей работе были предложены и исследованы различные протоколы модификации базовой криопротекторной среды холестерином, фосфатидилхолином (лецитином); проведены тесты на цитотоксичность и определена доля клеток с активными формами подвижности после криоконсервации для всех исследуемых сред.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве модельного объекта для исследования был выбран сперматозоид человека, поскольку для данных клеток разработаны четкие критерии оценки степени их выживаемости после разморозки. В работе было использовано более 15 эякулятов доноров, соответствующих критериям нормозооспермии (минимальные критерии основных показателей оценки сперматозоидов в пределах нормальных значений) [9]. Оценка доли выживших клеток проводилась по определению их индекса подвижности. Критерии подвижности, определенные в камере Маклера: категория а – прямолинейное быстрое движение, b – прямолинейное медленное движение, с – непрямолинейное движение, d – неподвижные сперматозоиды. К нормальным формам подвижности относят клетки с категориями а и b. Индекс подвижности рассчитывался по следующей формуле:

$$I = P_{(после)} / P_{(до)} * 100\%,$$

где $P_{до}$ и $P_{после}$ кол-во клеток с нормальными формами подвижности а+b до и после криоконсервации).

Для проверки соединения на цитотоксичность клетки инкубируются с исследуемым раствором в течении 90 минут, затем их показатели сравниваются с контрольным образцом. Если значение индекса подвижности после эксперимента больше 80%, то раствор считается не цитотоксичным. Клетки замораживались методом медленной заморозки (медленное поэтапное перемещение образцов в сосуде Дьюара, позволяющее всей системе приходить в состояние равновесия на каждом этапе). В работе были также использованы материалы: холестерин (Sigma), промышленный криопротектор на основе глицерина SpermFreeze (SpF) (LifeGlobal), среда для культивации сперматозоидов AllGradWash (LifeGlobal), гидроксипропил-бета-циклодекстрины (Hp-β-dx) (Sigma), растворы n-октана, декана, додекана, лиофилизованная пудра соевого лецитина (фосфатидилхолин) (Sigma). Для определения концентрации холестерина в мембране сравнивались следующие методы: ферментативный анализ, ИК-спектроскопия и метод Либермана-Бурхарда.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе были рассмотрены 3 метода по определению концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов: ферментативный метод, модифицированный метод Абея-Кендалла (Либермана-Бурхарда) и инфракрасная спектроскопия. Для каждого метода был разработан отдельный протокол специально для сперматозоидов человека. Сложность ферментативного метода заключается в том, что фермент холестериноксидаза активен лишь в отношении свободного холестерина, поэтому эфиросвязанный холестерин должен быть предварительно гидролизован при помощи фермента холестеринэстеразы. В свою очередь, для доступности холестерина этому ферменту, необходимо экстрагировать его из мембраны, что делалось при помощи детергента Triton X-100 (в течение 1 часа). Содержание холестерина измерялось по величине поглощения раствором света с длиной волны 513нм. Преимуществом метода инфракрасной спектроскопии заключается в том, что он не требует экстракции холестерина из мембран клеток (как правило именно эта часть самая токсичная и сложная). В ходе выполнения исследования вначале были построены ИК-спектры холестерина разной концентрации, затем по пику в спектре холестерина на волновом числе $\nu=2940 \text{ см}^{-1}$ была построена калибровочная прямая, по которой определялась масса холестерина в высушенном образце клеток. Метод Либермана-Бурхарда можно назвать эталонным для количественного определения холестерина, при помощи которого можно определить наномолярные концентрации вещества. Основной недостаток данного метода - его высокая токсичность: в состав необходимых соединений входят такие, как серная кислота, уксусный ангидрид, а также хлороформ и метанол для экстракции липидов. Так, экстракция холестерина из мембраны проводилась методом Фолча, для которого характерно использование достаточно больших объемов хлороформа и метанола и длительное время экспозиции. Содержание холестерина измерялось по величине поглощения света с длиной волны 650нм. Для построения калибровочной прямой были обработаны растворы с известными концентрациями холестерина от 0 до 200нмоль/мл. Все полученные в этой части работы результаты можно представить в виде таблицы 1.

Таблица 1. Концентрации холестерина, полученные тремя разными методами и сравнение их с литературными источниками [8]

Ферментативный анализ	ИК-спектроскопия	Абеля-Кендалла	Литературные данные
$C_{\phi} = 0,48 \pm 0,03$ нмоль/млн	$C_{\text{ИК}} \sim 5$ нмоль/млн	$C_{\text{АК}} = 1,53 \pm 0,15$ нмоль/млн	$C_{\text{лит}} = 1,2 \pm 0,3$ нмоль/млн

Из данной таблицы можно увидеть, что результат, полученный методом Абеля-Кендалла, лучше всего соотносится с литературными данными [5]. Значит, в дальнейшем, для точного определения концентраций холестерина нужно использовать именно его. Но другие методы имеют ряд значительных преимуществ перед методом Абеля-Кендалла (в первую очередь, это малая токсичность), поэтому необходимо модифицировать их протоколы в соответствии с указанными ранее предположениями.

Подбор концентраций и протоколы модификации криопротектора эмульсией яичного желтка и лецитином были нами разработаны ранее [4, 5]. Поэтому во второй части данной работы были проведены эксперименты по определению метода модификации базового криопротектора SpF холестерином. Основная проблема заключается в поиске оптимального растворителя для холестерина, с помощью которого он мог бы быть доставлен к суспензии клеток. Были предложены такие неполярные растворители как n-октан, декан и до-декан. Конечная концентрация холестерина составляла 100 нмоль/мл при концентрации клеток – 100 миллионов на миллилитр. Основное требование к растворам – их нетоксичность для сперматозоидов, поэтому конечная концентрация растворителя после добавления к криопротектору SpF составляла 10 мкл/мл. Результаты теста на цитотоксичность представлены в Таблице 2. Видно, что n-октан обладает наименьшей токсичностью для клеток, поэтому он был выбран в качестве растворителя холестерина и был использован в дальнейших экспериментах по модификации криопротектора.

Были использованы разные методики добавления раствора холестерина к клеткам и различные концентрации холестерина в итоговом растворе: добавление раствора холестерина к клеткам до смешивания с криопротектором; добавление непосредственно в криопротекторную среду; концентрации холестерина 100 нмоль/мл и 200 нмоль/мл. Однако ни один из способов модификации криопротектора раствором холестерина в n-октане не повысил выживаемость клеток после заморозки – разморозки. Из рисунка 1 видно, что статистически значимых отличий в индексе подвижности для образцов, замороженных с разными средами, нет.

Таблица 2. Тест на цитотоксичность. Сравнение доли живых клеток с положительными формами подвижности в присутствии различных неполярных растворителей и в присутствии эмульсии желтка (5,6 мг/мл)

Время инкубации	Нативный образец	Холестерин в декане	Холестерин в n-октане	Холестерин в додекане	Эмульсия желтка
00:00	100 ± 6	100 ± 6	100 ± 7	100 ± 6	100 ± 6
00:30	97 ± 6	70 ± 4	94 ± 6	66 ± 4	100 ± 6
01:00	94 ± 5	48 ± 3	77 ± 5	34 ± 2	87 ± 6
02:00	94 ± 5	12 ± 1	63 ± 4	19 ± 1	89 ± 5

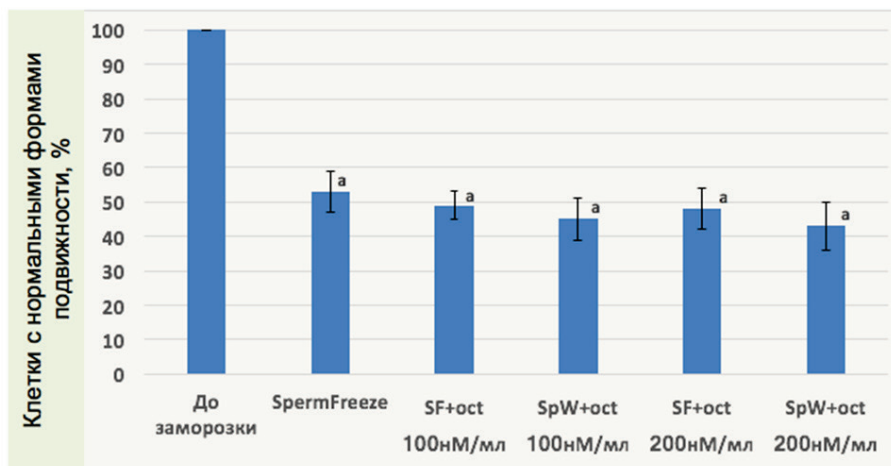


Рисунок 1. Оценка подвижности сперматозоидов до и после заморозки в криопротекторе SpF, а также с использованием раствора холестерина в n-октане (результат 10 экспериментов). Выборки с одинаковым буквенным индексом не имеют статистически достоверного различия

Таблица 3. Доли клеток с нормальными формами подвижности до и после криоконсервации с различными вариантами криопротектора относительно показателей образца до криоконсервации (N=15)

Вид криопротекторной среды	Нативный образец до заморозки	Sperm Freeze	SpF + эмульсия желтка	SpF + Холестерин в н-октане	SpF + β -dx-Chol	SpF + лецитин	SpF + β -dx
Индекс подвижности (%)	100 \pm 5	52,6 \pm 5,2 ^a	71,2 \pm 5,2 ^c	48,6 \pm 4,3 ^a	66,2 \pm 5,4 ^{b,c}	61 \pm 4,9 ^{a,b}	48,2 \pm 4,8 ^a

Согласно литературным данным модификация криопротектора холестерином может быть осуществлена с помощью специальных соединений – олигомеров глюкозы – бета-циклодекстринов [10]. Циклодекстрины способны связывать холестерин, создавать с ним комплексы и увеличивать его растворимость в полярных растворителях. Поэтому нами был разработан протоколы формирования комплексов β -циклодекстрин-холестерин (β -dx-Chol) и модификации криопротектора этими комплексами. Тест на цитотоксичность показал, что ни комплексы β -dx-Chol, ни отдельно циклодекстрины не являются токсичными для сперматозоидов (через 90 минут инкубации доля жизнеспособных клеток составляла 95 \pm 5%. Таким образом клетки инкубировались в течение 15 минут с комплексами β -dx-Chol (2 г/мл), а затем замораживались согласно протоколу медленной заморозки с добавлением криопротектора SpF. Для выяснения роли фосфатидилхолина при криоконсервации клеток в работе был предложен протокол модификации криопротектора SpF лецитином. Лиофилизованная пудра соевого лецитина растворялась в криопротекторе на основе глицерола в концентрации 50мг/мл, стоковый раствор добавлялся к образцу до итоговой концентрации лецитина 1,5 мг/мл (концентрация была выбрана исходя из литературных данных). Тест на цитотоксичность показал, что данный раствор также не является цитотоксичным для сперматозоидов. Результат сохранения активных форм сперматозоидов при криоконсервации с различными модификациями базового криопротектора SpF представлен в таблице 3.

Приведенные погрешности рассчитаны как стандартные ошибки среднего. Буквами a, b, c – обозначены статистически достоверно различимые выборки ($p < 0,05$). Выборки с одинаковым буквенным индексом не имеют статистически достоверного различия. Из таблицы 1 видно, что ближе всего к эмульсии яичного желтка по сохранению жизнеспособных клеток является модификация базового криопротектора комплексами β -циклодекстрин-холестерин. Добавление лецитина также повышает долю жизнеспособных клеток. Для подтверждения факта выживания клеток благодаря добавлению холестерина, а не циклодекстринов, в работе были заморожены образцы клеток с циклодекстринами без холестерина. Показано, что образцы, которые инкубировались с комплексами циклодекстрин-холестерин, обладают лучшей подвижностью, по сравнению с «пустыми» циклодекстринами. Плазматические мембраны при криоконсервации претерпевают фазовый переход, деформационные нагрузки, а также структурные изменения. Модификация криопротектора яичным желтком, являющимся многокомпонентным непроницающим криопротектором, позволяет снижать степень криоповреждений плазматических мембран. Исследования целостности мембран показали отсутствие статистически значимых различий между стандартным криопротектором SpF и SpF+лецитин. При этом показатели мембраны для криопротектора SpF+желток статистически значимо были лучше. Можно сделать вывод, что криопротекторное действие яичного желтка в отношении плазматических мембран имеет комплексный характер, а не обусловлено действием одного из его компонентов. Для создания альтернативной яичному желтку модификации, не имеющей животного происхождения, возможно стоит модифицировать базовую криопротекторную среду комплексами циклодекстрин-холестерин совместно с лецитином.

Список литературы / References:

1. Carpenter J.F., Kita Y.A., Crowe J.H. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis. *Cryobiology*, 1990, vol. 27, pp. 401-415.
2. Gilmore J.A. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *HUMAN REPRODUCTION*, 1997, vol. 12, no. 1, pp. 112-118.
3. Garde J.J., Olmo A., Soler A.J., Espeso G., Roldan E.R.S., Gomendio M. Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered Cuvier's gazelle (*Gazella cuvieri*). *Animal Reproduction Science*, 2008, no. 108, pp. 384-401.
4. Grigorieva A., Simonenko E., Garmaeva S., Mironova A. Human gametes cryopreservation with cryoprotectant modified by egg yolk. *CryoLetters*, 2019, vol. 40, no. 3, pp.187-192.
5. Grigoreva A., Garmaeva S., Yakovenko S., Simonenko E. Biophysical principles in human gametes cryopreservation: cryoprotectants modified by egg yolk. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2016, no. 1, pp. 70-73.
6. Meyer F., Smit B. Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2009, vol. 106, no.10, pp. 3654-3658.
7. Tilcock et al. Cation-dependent segregation phenomena and phase behavior in model membrane systems containing phosphatidylserine: Influence of cholesterol and acyl chain composition. *Biochemistry*, 1984, vol. 23, no. 12, pp. 2696-2703.

8. Darin-Bennett A., White I.G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, 1977, no. 14, pp. 466-470.
9. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th edition. *Kapital print*, 2012.
10. Lone S.A. Possible mechanisms of cholesterol-loaded cyclodextrin action on sperm during cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 2018, no. 192, pp. 1-5.

MODIFICATION OF CRYOPROTECTIVE MEDIUM BY EGG YOLK COMPONENTS TO INCREASE SURVIVAL OF HUMAN SPERMATOZOA AFTER CRYOPRESERVATION

Smolenceva D.¹, Mironova A.², Sibachin A.¹, Grigorieva A.A.¹, Yakovenko S.¹, Simonenko E.Yu.¹

¹ Lomonosov Moscow State University

Leninskie gory, 1, Moscow, 119991, Russia; e-mail: ksimonenko@inbox.ru

² Semenov Institute of Chemical Physics

Kosygina st., 4, Moscow, 119991, Russia

Abstract. Cryopreservation is a modern convenient method of storing biological material. However, cryopreservation can also lead to undesirable effects caused by damage of biological material. To protect cells from damage, cryoprotective media are used, including components penetrating into the cell (glycerin, DMSO) and non-penetrating (disaccharides, proteins). Egg Yolk is a non-penetrating component. Earlier in our work, it was shown that the modification of cryoprotectants with egg yolk suspension is one of the most effective methods for improving the survival of spermatozoa. However using compounds that are received from the animal for storing human cells is difficult. In this work the protocol of preparation of an egg yolk components: lecithin and cholesterol and the scheme of basic cryoprotectant SpermFreeze modification are suggested. Cytotoxicity tests have been done for various cholesterol solvents, the concentrations of all components were selected, changes in the sperm motility index after freezing and thawing were determined in all studied modifications of the cryoprotective medium. In this paper methods for measuring cholesterol concentration in sperm membranes were compared to select the optimal protocol. It has been also shown that modification of the base cryoprotectant with cyclodextrin-cholesterol complexes increases the survival rate of spermatozoa by 13% and is effective as with the addition of a suspension of egg yolk; the addition of lecithin does not significantly increase the effectiveness of the base cryoprotector. **Key words:** *cryoprotectant, egg yolk, lecithin, cholesterol, sperm motility, ART.*