

БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В КРИОКОНСЕРВАЦИИ ГАМЕТ ЧЕЛОВЕКА: МОДИФИКАЦИЯ КРИОПРОТЕКТОРА ЯИЧНЫМ ЖЕЛТКОМ.

Григорьева А.А.¹, Гармаева С.Б.¹, Яковенко С.А.^{1,2}, Симоненко Е.Ю.¹, Твердислов В.А.¹, Долганова А.А.², Апрышко В.П.²

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Ленинские горы, 1, г. Москва, Россия

²Клиника АльтраВита

ул. Нагорная, 4, г. Москва, Россия

Аннотация. Криоконсервация мужских половых гамет является одним из важнейших методов вспомогательных репродуктивных технологий, позволяющим сохранить гаметы перед началом лечения, способного повлиять на фертильность мужчины. Однако, оплодотворяющая способность сперматозоидов после криоконсервации уменьшается в среднем на 30-70 %, что обуславливает актуальность поиска новых веществ, обладающих криопротекторными свойствами. В работе был предложен протокол приготовления эмульсии яичного желтка и схема модификации ею криопротектанта. Данная модификация криопротектора показала положительное влияние на сохранность фертильных сперматозоидов: увеличила число гамет с нормальными типами подвижности после криоконсервации на 20 %, а также уменьшила степень морфологических дефектов. Эмульсия, приготовленная по разработанному протоколу, была проверена на цитотоксичность и сравнивалась с коммерческим криопротектантом, содержащим яичный желток.

Ключевые слова: гаметы, криопротектор, сперматозоиды, ВРТ, криоконсервация

BIOPHYSICAL PRINCIPLES IN HUMAN GAMETES CRYOPRESERVATION: CRYOPROTECTANTS MODIFIED BY EGG YOLK.

Grigoreva A.A.¹, Garmaeva S.B.¹, Yakovenko S.A.^{1,2}, Simonenko E.Yu.¹, Tverdislov V.A.¹, Dolganova A.A.², Apyrshko V.P.²

¹Lomonosov Moscow State University

Leninskie gori, 1, Moscow, Russia

²IVF Clinic AltraVita

Nagornaya st., 4, Moscow, Russia

Abstract. Cryopreservation of human gametes is one of the most important methods of IVF allowing to save functional gametes prior to the treatment which might threaten male fertility. However, fertilizing capacity of spermatozoa after cryopreservation decreases by 30-70 % on average, explaining the relevance of search for new substances and protocols possessing improved cryoprotective properties. In this work we suggested modification of cryoprotectant by addition of specifically prepared egg yolk emulsion. Such modification showed positive influence on safety of fertile spermatozoa, - increasing the mean number of normal motile gametes after cryopreservation by 20 % and decreasing morphological defectiveness. The emulsion was tested for cytotoxicity and compared with commercially available cryoprotectant containing egg yolk.

Keywords: gametes, cryoprotectant, spermatozoa, IVF, cryopreservation.

Заморозка мужских половых гамет является одним из перспективных методов вспомогательных репродуктивных технологий. Криоконсервация спермы позволяет сохранить гаметы до начала лечения, способного снизить фертильность мужчины или стать причиной бесплодия; в случае малого объема материала (олигоспермия) несколько порций эякулятов могут быть заморожены и скомбинированы позднее; при большом объёме единственный эякулят может быть использован в нескольких циклах инсеминации (ИКСИ); при транспортировке на большие расстояния и для хранения донорских образцов. На сегодняшний день ни одна клиника вспомогательных репродуктивных технологий не обходится без криоконсервации тканей и гамет. Однако, в процессе криоконсервации клетки повреждаются, что влияет на их подвижность и морфологические показатели, которые значительно уменьшаются в среднем на 30-70%. Для защиты клеток при криоконсервации используют специальные вещества - криопротекторы с различными механизмами действия, но, несмотря на их применение, выживаемость клеток после процедуры заморозки – разморозки довольно низкая, что является особенно критичным при хранении малого числа клеток.

Большое количество химических соединений было оценено на возможность применения их в качестве криопротектора. Однако, из-за высокой цитотоксичности и низкой эффективности, в настоящее время используется только 4 вида соединений в качестве проникающих криопротекторов (глицерин, этиленгликоль, ДМСО, пропиленгликоль) и активно ведется поиск среди непроникающих компонент. При использовании криопротекторов, непроникающих в клетку, уменьшается поток воды через мембрану, а следовательно и осмотический стресс. При этом внутриклеточное содержимое обезвоживается в степени, достаточной для того, чтобы внутриклеточная кристаллизация не вызывала летальных повреждений. Фософлипиды и триглицериды могут рассматриваться как непроникающие криопротекторы. К таким соединениям относится и яичный желток. Модификация криопротектантов суспензией яичного желтка - один из наиболее эффективных методов улучшения выживаемости сперматозоидов, описанных в литературе на сперме животных [1-3]. Механизм действия желтка, эффективность его применения при криоконсервации спермы человека, а также различные

аспекты процедуры модификации криопротектантов яичным желтком остаются в значительной степени неизвестными. В связи с этим, интересны вопросы о разработке оптимальной схемы модификации криопротектанта яичным желтком для последующего хранения спермы человека и об исследовании влияния яичного желтка на фертильность и морфологию сперматозоидов после заморозки.

В работе был предложен протокол приготовления базового раствора эмульсии яичного желтка (egg yolks from chicken, SIGMA, SpermWash Medium, SAGE; 3:37 по массе) с использованием ультразвуковой ванны (35 кГц, 10 мин) и последующего центрифугирования (3000 об/мин, 10 мин). Базовый раствор (24,7 мг/мл) добавлялся в SpermFreeze (Sage). Экспериментальная работа проводилась на 52 эякулятах доноров и пациентов с нормозооспермией (концентрация сперматозоидов >15 млн/мл, категорий подвижности a+b > = 32 %, морфологически нормальных сперматозоидов по критериям Крюгера (см. рис. 1) N > = 4 %).



Рисунок 1 – Сперматозоид с нормальным строением шейки и хвоста

Для каждого образца исследовалась как нативная, так и очищенная (отмытая в градиенте) сперма.

В первой серии экспериментов на 18 образцах эякулята доноров было показано, что число активно подвижных сперматозоидов (тип a+b) после заморозки с промышленным криопротектором уменьшается в среднем на 35 %.

Далее для подбора оптимальной концентрации желтка был проведен анализ подвижностей типа a+b на 20 образцах спермы (до заморозки, после заморозки: контроль, с криопротектантом без желтка, с добавлением желтка различных концентраций) было выяснено, что эффективность модификации криопротектанта яичным желтком увеличивается с ростом концентрации яичного желтка в криопротекторе до концентрации 1,7 мг/мл, причем жизнеспособность сперматозоидов с подвижностью a+b повышается на 20 %, по сравнению с криопротектантом без желтка. При дальнейшем увеличении концентрации желтка показатели подвижности не изменяются. Для дальнейших исследований были выбраны концентрации из рабочего диапазона: 2,8 мг/мл и 5,6 мг/мл.

Для окончательного выбора рабочей концентрации была проведена серия из 13 экспериментов по заморозке образцов очищенных сперматозоидов с модифицированным криопротектором с концентрациями желтка 2,8 мг/мл и 5,6 мг/мл. Значимых различий в основных морфологических характеристиках сперматозоида при замораживании в двух выбранных нами концентрациях желтка нет. Для дальнейших экспериментов из соображений удобства приготовления раствора была выбрана концентрация желтка 5,6 мг/мл.

Далее на 19 образцах были проанализированы дефекты различных структур клеток (процентная доля гамет с дефектом шейки, дефектом хвоста, наличием цитоплазматической капли) и подвижность сперматозоидов при криоконсервации по стандартному протоколу и с модифицированным желтком криопротектантом (концентрация 5,6 мг/мл).

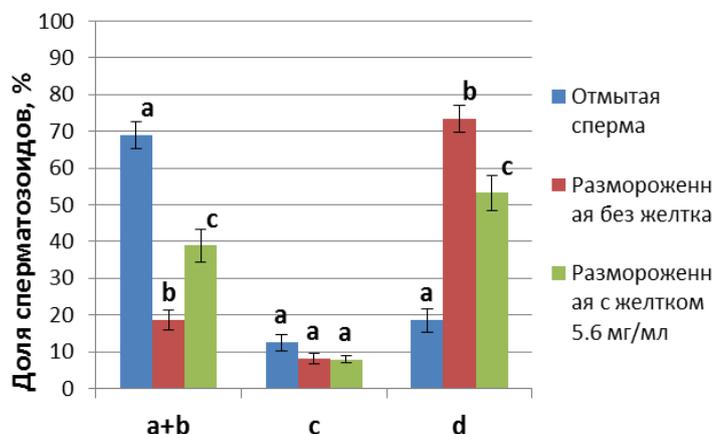


Рисунок 2 – Оценка показателей подвижности сперматозоидов до и после заморозки образцов очищенных сперматозоидов с двумя модификациями криопротектанта.

Буквами a, b, c - обозначены статистически достоверно различимые выборки ($p < 0.05$). Выборки с одинаковым буквенным индексом не имеют статистически достоверного различия

Из результатов, представленных на рисунке 2, видно, что после заморозки с криопротектором, содержащим желток, жизнеспособных сперматозоидов с подвижностью a+b на 20 % больше, чем в образцах без желтка. При этом доля неподвижных клеток значительно увеличивается при замораживании в отсутствие желтка.

Оценка морфологии клеток (см. табл. 1) показала, что после заморозки с криопротектором, модифицированным яичным желтком, процентная доля сперматозоидов с дефектом шейки или средней части уменьшилась на 6 % ($P \leq 0.05$), с дефектом хвостовой части уменьшилась на 2,6 % ($P \leq 0.1$), статистически значимых различий в процентных долях сперматозоидов с цитоплазматической каплей не выявлено.

Таблица 1 – Оценка морфологических показателей сперматозоидов до и после заморозки образцов очищенных сперматозоидов с двумя модификациями криопротектанта Буквами a, b, c - обозначены статистически достоверно различные выборки ($p < 0.05$). Выборки с одинаковым буквенным индексом не имеют статистически достоверного различия

	Доля хороших сперматозоидов, %	Доля сперматозоидов с дефектом шейки или средней части, %	Доля сперматозоидов с дефектом хвоста, %	Доля сперматозоидов с цитоплазматической каплей, %
Нативная сперма	3,3 ± 0,5 ^{a,b}	14,6 ± 1,7 ^a	4,6 ± 0,6 ^a	10,4 ± 1,4 ^a
Отмытая сперма	4,0 ± 0,5 ^a	13,1 ± 1,4 ^a	6,9 ± 1,0 ^a	4,8 ± 1,0 ^b
Размороженная без желтка	2,8 ± 0,4 ^b	22,6 ± 2,2 ^b	14,6 ± 1,2 ^b	5,1 ± 1,0 ^b
Размороженная с желтком 5,6 мг/мл	3,2 ± 0,4 ^{a,b}	16,6 ± 1,7 ^a	12,0 ± 1,0 ^b	3,8 ± 0,9 ^b

Далее был проведён тест на цитотоксичность эмульсии яичного желтка, для чего нативные образцы эякулята инкубировались с эмульсией приготовленной по предложенному протоколу и промышленным криопротектором, содержащим яичный желток (Test Yolk Buffer), в качестве контроля был использован нативный образец. Выживаемость сперматозоидов определялась путём оценки подвижности на временных интервалах: 30 минут, 1 час, 2 часа.

Таблица 2 – Оценка процентной доли сперматозоидов с нормальными категориями подвижности (a и b) при инкубировании в различных растворах

Время инкубирования	Нативный образец	Test Yolk Buffer	Эмульсия яичного желтка
00:00	54		
00:30	64	51	54
01:00	66	44	46
02:00	47	39	48

Из представленных результатов (табл. 2) видим, что через 2 часа инкубации процент нормально подвижных сперматозоидов в нативном образце и в образце с эмульсией яичного желтка практически равны. Более низкий процент подвижных сперматозоидов в образце с промышленным криопротектором можно объяснить наличием в его составе цитотоксичных проникающих компонентов, таких как глицерол.

Таким образом, яичный желток не обладает цитотоксическим действием, а его добавление в криопротектор в разной степени уменьшает все рассмотренные повреждения клеток при криоконсервации. В отсутствие желтка повышается доля, как дефектов шеек, так и число разрушенных клеток, что говорит о сильном повреждении клеток при заморозке с глицерол содержащими криопротектантами. В целом доля морфологически нормальных клеток повышается в присутствии желтка. Мы предполагаем возможность образования на поверхности спермиев покрытия из липидо-гликопротеиновых комплексов, образующихся при взаимодействии компонентов желтка с поверхностью цитоплазматической мембраны спермиев, что приводит к значительному снижению интенсивности осмотических и диффузионных процессов, протекающих между клеткой и окружающей средой.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект №14-50-00029).

Список литературы:

1. 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.
2. Salmani H., Towhidi A., Zhandi M., Bahreini M., Sharafi M. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology*, 2014, no. 68, pp. 276-280.
3. Yildiz C., Bozkurt Y., Yavas I. An evaluation of soybean lecithin as an alternative to avian egg yolk in the cryopreservation of fish sperm. *Cryobiology*, 2013, no. 67, pp. 91-94.

ПРОМЫШЛЕННАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОМАССЫ МОРСКОЙ ДИАТОМЕИ *CYLINDROTHECA CLOSTERIUM* (EHRENBERG) REIMANN & LEWIN С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГАЗОВИХРЕВОГО ФОТОБИОРЕАКТОРА

Геворгиз Р.Г.¹, Железнова С.Н.¹, Зозуля Ю.В.², Уваров И.П.², Репков А.П.², Лелеков А.С.¹

¹ ФГБУН Институт морских биологических исследований им. А.О.Ковалевского РАН

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ

e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

² ООО «МикроБиоТехнологии»

ул. Демакова, 30, Новосибирская обл., Советский район (Академгородок), 630128, Россия

e-mail: microbiotex@mail.ru

Аннотация. В работе использовали газовихревой фотобиореактор, который разработан на основе новых принципов перемешивания суспензии микроводорослей. Рабочий объём суспензии в фотобиореакторе составлял 580 л, рабочий слой — 0,08 м, освещаемая поверхность — 7,3 кв.м. В качестве источника освещения использовались лампы ДРЛ-700, которые давали среднюю освещённость на поверхности культуры 7,1 клк (≈ 30 Вт/кв.м). Максимальная продуктивность интенсивной культуры *C. closterium*, которую выращивали на среде RS, в промышленном фотобиореакторе достигала 1,2 г.сух.массы/л (или 95 г.сух.массы/(сут*кв.м)), что в 3-4 раза превышает показатели других систем культивирования. При сборе урожая сгущали суспензию за счет естественного свойства бентосных диатомей оседать на дно. После сгущения биомассу *C. closterium* фильтровали через ткань. Процедуры осаждения и фильтрования биомассы затраты электроэнергии не потребовали. За 15 дней культивирования получено 3.5 кг сухой биомассы. Таким образом, впервые разработана промышленная технология производства биомассы бентосно-планктонной морской диатомеи *C. closterium* с использованием газовихревого фотобиореактора.

Ключевые слова: биомасса, плотная культура, интенсивная культура

INDUSTRIAL PRODUCTION TECHNOLOGY BIOMASS MARINE DIATOMS *CYLINDROTHECA CLOSTERIUM* (EHRENBERG) REIMANN & LEWIN USING GAS VORTEX PHOTOBIOREACTOR

Gevorgiz R.G.¹, Zheleznova S.N.¹, Zozulya Y.V.², Uvarov I.P.², Repkov A.P.², Lelekov A.S.¹

¹ A.O. Kovalevsky Institute of Marine Biological Research of RAS

Nakhimov Av., 2, Sevastopol, 299011, Russia

e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

² «MicroBioTechnology», Novosibirsk.

e-mail: microbiotex@mail.ru

Abstract. The gas vortex photobioreactor, which is based on new concepts of agitation a microalgae suspension was used. Working volume of suspension in photobioreactor is 580 liters, the working layer - 0.08 m, the illuminated surface - 7.3 sq.m. As a light source used lamps DRL-700, which gave the average illuminance on the surface of culture 7.1 klx (≈ 30 W / m²). Maximum productivity of *C. Closterium* intensive culture, which is grown in RS media, in an industrial photobioreactor reached 1.2 g. of dry.mass / L (or 95 g. dry weight/(day*sq.m)), which is 3- 4 times higher than in other culture systems. At harvest suspension is concentrated of due to the natural properties of the benthic diatoms to sink to the bottom. After concentrating the biomass of *C. closterium* is filtered through a cloth. Procedures for settling and filtration of biomass electricity costs are not required. During the 15 days of culture 3.5 kg of dry biomass was produced. Thus, the first commercial biomass production technology benthic-planktonic marine diatom *C. closterium* is developed with the use of gas-vortex photobioreactor.

Key words: biomass, a dense culture, intensive culture

Современная наука насчитывает более 30000 видов микроводорослей. Каждый вид обладает своими уникальными особенностями метаболизма и биохимического состава, что дает неограниченные возможности в создании новых биотехнологий производства как самой биомассы микроводорослей, так и ценных для медицины, пищевой промышленности, сельского хозяйства и т.д. органических соединений природного происхождения [1-8]. Особый интерес представляют морские микроводоросли, поскольку в процессе своей жизнедеятельности они способны синтезировать ряд уникальных физиологически активных соединений, аналогов которым нет ни у пресноводных микроводорослей, ни у высших растений, ни у других групп организмов [1,6,8].