

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА  
НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 541.123.2:546.33.175:546.657

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВОДНО-СОЛЕВЫХ СТЕКЛООБРАЗУЮЩИХ  
СИСТЕМ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ СПЕРМЫ ЧЕЛОВЕКА  
К ГИПОТЕРМИЧЕСКОМУ СПОСОБУ ХРАНЕНИЯ

© 2020 г. И. А. Кириленко<sup>a,\*</sup>, А. А. Винокуров<sup>b</sup>, В. П. Данилов<sup>a</sup>, В. Г. Барчуков<sup>c</sup>, И. А. Ефименко<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, Ленинский пр-т, 31, Москва, 119991 Россия

<sup>b</sup>Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева Минздрава России, ул. Саморы Машела, 1, Москва, 117997 Россия

<sup>c</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, ул. Островитянина, 1, Москва, 117997 Россия

\*e-mail: iakirilenko@mail.ru

Поступила в редакцию 20.12.2019 г.

После доработки 22.01.2020 г.

Принята к публикации 27.01.2020 г.

Впервые разработан протектор для гипотермического хранения спермы человека на основе водно-солевого стеклообразующего раствора ацетатов жизненно важных металлов: магния, цинка, кальция. Предложен метод консервации спермы без предварительного отмывания семенной плазмы, способствующий сохранению параметров жизнеспособности спермы и подвижности сперматозоидов, сопоставимых с показателями нативной спермы. Использование предлагаемого протектора и метода подготовки спермы человека для гипотермического хранения на первом этапе способствует замедлению метаболизма, о чем свидетельствует полная потеря подвижности сперматозоидов и сохранение близкой к 100% жизнеспособности исследованной спермы. После отмывания протектора происходит восстановление подвижности сперматозоидов на 90–100% по сравнению с показателями нативной спермы.

**Ключевые слова:** протектор, водно-солевой раствор, подвижность и жизнеспособность сперматозоидов, криоконсервация

DOI: 10.31857/S0044457X20060082

## ВВЕДЕНИЕ

Сохранение жизнеспособности различных биосистем вне организма остается одной из важнейших проблем трансплантации клеток и органов. Для решения этих задач часто используются криопротекторы, уменьшающие интенсивность адаптационного процесса и снижающие уровень клеточного метаболизма, что делает клетки менее восприимчивыми к криоповреждениям.

В настоящее время основной способ хранения различных биоматериалов – криоконсервация. В качестве перспективных криопротекторов апробировано больше 120 веществ, принадлежащих к разным классам химических соединений, в основном органических [1–7]. С целью поддержания энергетического обмена в размороженных клетках и уменьшения токсичности органических консервантов к органическим криопротекторам добавляют полимеры, белки плазмы, глюкозу, неорганические соли.

При использовании криопротекторов происходит повреждение клеточных структур. Основ-

ными причинами этого являются процессы, которые происходят вследствие обезвоживания, токсичности органических консервантов и образования вне- и внутриклеточных кристаллов льда.

Существует более мягкий способ консервации, в частности спермы человека, предложенный в 1996 г. группой исследователей из Университета Йокагамы [8]. Суть метода состоит в хранении спермы в бессолевом водном растворе глюкозы и бычьего сывороточного альбумина при температуре +4°C. Консервирующая среда, названная авторами EFM (electrolyte free medium), позволяет сохранить сперму человека максимум в течение двух недель. После двухнедельного хранения в EFM подвижность восстанавливается у немногим более 50% сперматозоидов [8–14].

Следует отметить, что перед консервацией сперматозоиды отмываются от семенной плазмы с помощью центрифугирования смеси нативной спермы и набора Supra Sperm System, что лишает их природной среды обитания.

Гипотермическое хранение уступает криоконсервации по длительности, но при этом не требует специального криологического оборудования и не зависит от источника замораживающих агентов. В настоящее время метод находится в стадии исследования условий, необходимых для улучшения показателей жизнеспособности и подвижности сохраняемой спермы [8–16].

Анализ результатов многолетних систематических исследований процессов стеклообразования в водно-солевых системах при низких температурах позволил выявить составы растворов, которые на этапах охлаждения и замораживания в жидком азоте и последующего размораживания не кристаллизуются. В результате был сделан выбор предложенной нами водно-солевой системы, которая явилась основой для разработки методики по предупреждению кристаллизации льда – одного из основных факторов повреждения биологических объектов при их консервации [17–20].

Согласно [18], система  $Mg(CH_3COO)_2 - Zn(CH_3COO)_2 - Ca(CH_3COO)_2 - H_2O$  является стеклообразующей, следовательно, способна предотвращать образование льда на этапах охлаждения и нагревания сперматозоидов при их консервации и расконсервации.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для приготовления растворов использовали реактивы марки “ч. д. а.”:  $Mg(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$ ,  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ,  $Ca(CH_3COO)_2 \cdot 0.4H_2O$ . Растворы готовили весовым разбавлением.

Исследование влияния предлагаемого протектора на жизнеспособность спермы и подвижность сперматозоидов проводили в соответствии со стандартами ВОЗ [21].

Анализ нативного эякулята осуществляли по методике, описанной ранее [21]. Оценку жизнеспособности спермы и подвижности клеток проводили с помощью световой микроскопии при увеличении  $\times 400$  с использованием стандартного красителя эозина. Эозин (Эозин Y (С.1. 45380)) разбавляли буфером Ferti Pro Flushing medium в соотношении 0.05 г эозина на 10 мл буфера. Погрешность при определении показателей жизнеспособности спермы и подвижности сперматозоидов не превышала 10%.

**Определение жизнеспособности спермы и подвижности сперматозоидов.** В соответствии с методикой [21] жизнеспособность спермы оценивали по двум категориям: окрашенные – мертвые сперматозоиды, неокрашенные – живые (табл. 1). Подвижность сперматозоидов оценивали по трем категориям: прогрессивно подвижные, непрогрессивно подвижные, полностью неподвижные сперматозоиды.

**Определение жизнеспособности спермы и подвижности сперматозоидов после использования протектора.** Исследуемый протектор добавляли к нативному эякуляту в соотношении 1 : 5. Полученную суспензию перемешивали пипетированием. Спустя 15 мин на два предметных стекла наносили по 10 мкл суспензии для определения жизнеспособности спермы и подвижности сперматозоидов.

**Определение жизнеспособности спермы и подвижности сперматозоидов после разбавления суспензии буфером (отмывание клеток от протектора).** Полученную при взаимодействии спермы и протектора суспензию разбавляли буфером Ferti Pro Flushing medium в соотношении 1 : 4, через 15 мин подсчитывали количество сперматозоидов и оценивали их подвижность. Результат выражали в процентах.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Предлагаемый протектор является стеклообразующей водно-солевой системой, способной предотвращать образование льда на этапах охлаждения и нагревания сперматозоидов, т.е. при их консервации и расконсервации. Следует отметить, что входящие в состав протектора соли содержат ионы цинка, магния и кальция, которые жизненно необходимы для организма человека. Цинк – основной строительный материал для тестостерона. Именно цинк обеспечивает фертильность спермы. Магний – важнейший элемент в жизнедеятельности организма человека, участвующий в метаболизме. Ионы кальция обладают особенностью проникать в цитоплазму, снижая энергетический “уровень” митохондрий, и тем самым способствуют процессу консервации. Ацетаты цинка, кальция и магния (E650, E263, E343 соответственно) известны как лекарственные препараты и пищевые добавки, что может свидетельствовать об их минимальной токсичности.

В табл. 1 представлены исходные параметры образцов нативной спермы пяти человек. Предлагаемый метод подготовки спермы для гипотермического способа хранения без предварительного отмывания семенной плазмы способствует сохранению природной среды для спермы, в отличие от методик, описанных в работах [5–11].

Данные о жизнеспособности спермы после взаимодействия с протектором (содержание живых сперматозоидов составляет от 78 до 95%) полностью совпадают с аналогичными показателями нативных образцов (77–93%), т.е. при взаимодействии с протектором жизнеспособность спермы по сравнению с исходным материалом в пределах ошибки сохранилась почти на 100%, при этом сперматозоиды полностью обездвижились (табл. 1).

**Таблица 1.** Показатели жизнеспособности спермы и подвижности сперматозоидов

№ опыта	Количество сперматозоидов, %			
	живых	прогрессивно подвижных	непрогрессивно подвижных	полностью неподвижных
Нативный эякулят				
1	93	72	15	13
2	77	64	15	21
3	89	53	13	34
4	77	64	15	21
5	80	76	10	14
После использования протектора				
1	95	0	1	99
2	78	0	0	100
3	87	0	0	100
4	78	0	1	99
5	90	0	0	100
После разбавления суспензии спермы с протектором буфером				
1	95	67	19	14
2	78	54	13	33
3	87	54	16	30
4	78	62	15	23
5	85	71	18	11

Полученные данные свидетельствуют также о возобновлении подвижности клеток после отмывания протектора почти на 100% по сравнению с нативной спермой.

Предлагаемый метод подготовки спермы для гипотермического способа хранения без предварительного отмывания семенной плазмы способствует сохранению природной среды для спермы. В ходе исследования установлено, что оптимальное соотношение протектора и нативной спермы при их смешивании, способствующее получению лучших результатов по жизнеспособности спермы и подвижности сперматозоидов, соответствует соотношению 1 : 5. Этот вывод сделан на основании анализа 10-ти вариантов пропорций смешивания от 1 : 1 до 1 : 10 (данные не приведены). Рассмотрены возможные способы отмывания суспензии от протектора буфером с разведением в пропорции 1 : 4, 1 : 6, 1 : 8. Оптимальным признан вариант 1 : 4.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование предлагаемого протектора и метода подготовки спермы человека для гипотермического хранения на первом этапе способствует замедлению метаболизма, о чем свидетельствует полная потеря подвижности сперматозоидов и сохранение близкой к 100% жизнеспособности

исследованной спермы. После отмывания протектора происходит восстановление подвижности сперматозоидов на 90–100% по сравнению с нативной спермой.

Предлагаемые к использованию протектор и метод консервации на стадии подготовки к замораживанию демонстрируют высокую эффективность и перспективность.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных научных исследований Президиума РАН № 37 “Фундаментальные основы создания металлических, керамических и композиционных конструкционных материалов с повышенным комплексом эксплуатационных характеристик”, программы фундаментальных научных исследований Президиума РАН № 39 “Фундаментальные основы и энергоэффективные, ресурсосберегающие, инновационные технологии переработки минерального сырья, утилизации промышленных и бытовых отходов”.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Костяев А.А., Мартусевич А.К., Андреев А.А.* // Научное обозрение. Медицинские науки. 2016. № 6. С. 54.
2. *Kuleshova L.L., Shaw J.M., Trouson A.O.* // Cryobiology. 2001. V. 43. № 1. P. 21.
3. *Kanno H., Kajwara K., Miyta K.* // J. Chem. Phys. 2010. V. 132. P. 1945.
4. *Hunt C.J.* // Transfusion Medicine and Hemotherapy. 2019. V. 46. № 3. P. 134.
5. *Арутинян И.В., Строчкова С.О., Макаров А.В. и др.* // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2018. № 3. С. 180.
6. *Строчкова С.О., Арутинян И.В., Муллабаева С.М. и др.* // Акушерство и гинекология. 2018. № 12. С. 5.
7. *Синева О.Н., Иванкова Т.Д., Терехова Л.П.* // Антибиотики и химиотерапия. 2019. № 3–4. С. 3.
8. *Saito K., Kinoshita Y., Kanno H.* // Fertility and Sterility. 1996. V. 65. № 6. P. 1210.
9. *Kanno H., Saito K., Ogawa T.* // Fertility and Sterility. 1998. V. 69. № 1. P. 127.  
[https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(97\)00439-1](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(97)00439-1)
10. *Riel J.M., Huang T.T., Ward M.A.* // Arch. Androl. 2007. V. 53. № 5. P. 275.
11. *Riel J.M., Yamauchi Y., Huang T.T.* // Biology of Reproduction. 2011. V. 85. № 3. P. 536.  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.091322>
12. *Morisawa M., Yoshida M.* // Reproductive Medicina Biol. 2005. № 4. P. 101.
13. *Исаев Д.А., Заева В.В., Бакурадзе Р.В. и др.* // Проблемы репродукции. 2009. № 5. С. 33.
14. *Исаев Д.А., Захарова Е.Е., Капралова И.В. и др.* // Проблемы репродукции. 2015. № 4. С. 65.  
<https://doi.org/10.17116/gerpro201521465-70>
15. *Черкашина И.В.* // Влияние перфторана на функциональные характеристики спермиев при гипотермическом хранении и криоконсервации. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Харьков. 2007.
16. *Одинцов А.А., Кучков И.Н., Черкашина И.В. и др.* // Современная технология в медицине. 2011. Т. 3. С. 47.
17. *Кириленко И.А.* Водно-электролитные стеклообразующие системы. М.: Красанд, 2016. 256 с.
18. *Kirilenko I.A.* // Russ. J. Inorg. Chem. 2017. V. 62. № 14. P. 1819.  
<https://doi.org/10.1134/S00360236171140042>
19. *Kirilenko I.A.* // Russ. J. Inorg. Chem. 2018. V. 63. № 13. P. 1728.  
<https://doi.org/10.1134/S0036023618130053>
20. *Kirilenko L.I., Demina L.I., Danilov V.P.* // Russ. J. Inorg. Chem. 2019. V. 64. № 10. P. 1282. [*Кириленко И.А., Демина Л.И., Данилов В.П.* // Журн. неорганической химии. 2019. Т. 64. № 10. С. 1282.]  
<https://doi.org/10.1134/S0036023619100073>
21. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека // World Health Organization. М.: Капитал Принт, 2012. 285 с.