

**МЕХАНИЗМ АДАПТАЦИИ СПЕРМАТОЗОИДОВ
К ДЕЙСТВИЮ УСЛОВИЙ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ**

Максимюк Анна Васильевна

канд. биол. наук, доцент

*Львовского национального медицинского университета им. Д. Галицкого,
Украина, г. Львов,*

E-mail: hanna.maksymjuk@gmail.com

Воробец Зиновий Дмитриевич

д-р биол. наук, профессор

*Львовского национального медицинского университета им. Д. Галицкого,
Украина, г. Львов*

E-mail: vorobets@meduniv.lviv.ua

**MECHANISM OF SPERM ADAPTATION
TO CRYOPRESERVATION CONDITIONS**

Maksymjuk Anna

candidate of Biological Sciences, associate Professor

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ukraine, Lviv

Vorobets Zinovij

doctor of Biological Sciences, Professor,

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ukraine, Lviv

АННОТАЦИЯ

Изучили изменения концентрации ионов в системе «среда-клетка» в разных условиях технологии криоконсервации спермы. При деконсервации образцов установили антипортное движение Na^+ в клетки, а Ca^{2+} и K^+ из них. Возможно, эти процессы обеспечивают переход сперматозоидов из анабиоза в активное состояние.

ABSTRACT

The subject of research are changes of ions concentration in the “medium-cell” system under the various cryopreservation technologies. During depreservation of samples we observed antiport motion of Na^+ inbound the cells and Ca^{2+} , K^+ outbound. Supposedly these processes provide transition of sperm from a passive anabiosis state to an active state.

Ключевые слова: сперма, криоконсервация, кальций, калий, натрий, защитная среда.

Keywords: semen, cryopreservation, calcium, potassium, sodium, protective medium.

Вступление. Доказано, что полноценность структуры и функций сперматозоидов зависит от состава, концентрации и отношений в сперме неорганических и органических соединений [2, с. 83; 3, с. 91; 4, с. 46; 5, с. 82]. Важное место среди этих агентов влияния принадлежит Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , которые не только принимают активное участие в процессах преобразования одного вида аккумулированной энергии в иную, но и регулируют обмен питательных веществ в клетках и органах. В этой связи эффективность разрешения текущих проблем криобиологической науки существенно зависит от объективности знаний отдельных моментов многогранного процесса адаптации клеток к действию экзогенных факторов.

Однако имеющиеся сегодня результаты выполненных исследований [9, с. 290; 10, с. 111; 11, с. 491] ещё не позволяют создать эффективную модель, постулаты которой в будущем обеспечат максимально возможное сохранение количества полноценных сперматозоидов в сперме. По этому поводу конкретизация и детализация изменений состояния клеток и гомеостаза ионов системы “среда-клетка”, с учётом внедрённых в практику требований существующих технологий криоконсервации спермы (ТКС), имеют важное значение для поиска способов и средств оптимизации их вредного действия.

Поскольку уровень оплодотворяющей способности сперматозоидов зависит от изменений жизнеспособности, состояния их акросомы и цитоплазматической мембраны, гомеостаза Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , то цель выполненной работы состоит в определении признаков, которые помогут обосновать возможный механизм адаптации клеток к вредному влиянию условий ТКС.

Материал и методы исследований. В свежеполученных, разведенных, эквilibрированных и деконсервированных образцах спермы, методом электронной микроскопии [6, с. 186] определяли особенности изменений акросомы и цитоплазматической мембраны сперматозоидов. Изменения количества живых клеток и их подвижности оценивали методом световой микроскопии [1, с. 25]. В открытых системах («среда-клетка»), методом пламенной фотометрии [7, с. 10], изучали особенности изменения концентрации Ca^{2+} , K^+ , Na^+ . Для статистической обработки результатов исследований использовали программу Microsoft Excel.

Результаты исследований. Исследования особенностей влияния экзогенных факторов на состояние структуры сперматозоидов нативной неразбавленной спермы высокого качества свидетельствуют о том, что 81—82 % её половых клеток имеют типичную форму. Поверхность головки таких сперматозоидов четко выделена плотной акросомой; шейки, тела и хвоста — цитоплазматической мембраной (табл. 1, 2).

Таблица 1.

Абсолютные изменения структуры и функций сперматозоидов

Сперматозоиды	Защитные среды	Сперма			
		неразбавленная	разбавленная	эквilibрированная	деконсервированная
Типичные (M±m, %)	НС*	80,81±2,48	—	27,47±3,27	7,42±0,82
	НС**	80,81±2,48	—	27,47±3,27	0,00
	ВРК	81,67±2,05	72,47±2,45	57,94±2,87	10,91±1,401
	ЗС _к	80,55±1,69	74,61±2,20	62,17±2,86	35,94±1,06
	ЗС _о	81,62±1,82	79,64±0,83	68,64±2,65	52,92±1,48
Живые (M±m, %)	НС*	67,39±0,76	—	22,75±4,01	М
	НС**	67,39±0,76	—	22,75±4,01	М
	ВРК	68,61±1,51	51,43±2,32	44,01±3,46	М
	ЗС _к	67,59±0,87	57,86±2,00	47,61±1,19	30,05±0,72
	ЗС _о	68,44±2,46	67,19±1,82	52,39±1,39	41,17±1,50
Подвижные (M±m, бал)	НС*	8,52±0,19	—	3,63±0,34	0,00
	НС**	8,52±0,19	—	3,63±0,34	0,00
	ВРК	8,38±0,27	7,58±0,19	4,73±0,31	К
	ЗС _к	7,81±0,19	7,28±0,21	4,50±0,34	3,55±0,21
	ЗС _о	8,11±0,25	7,66±0,25	6,50±0,15	4,07±0,16

Примечание: НС* — неразбавленная сперма, деконсервированная без цитрата, НС** — деконсервированная в цитрате, ВРК — водные растворы криопротекторов, ЗС_к — защитная среда, контроль, ЗС_о — защитная среда, опыт. М — мертвые сперматозоиды, К — колебательное движение сперматозоидов.

После разбавления спермы ВРК, а также ЗС_к и ЗС_о, в зависимости от их действия, число клеток типичной формы составляет 72—80 %. Четырехчасовое выдерживание разбавленной спермы в термостате при 37 °С снижает их количество до 27—67 %, а её деконсервация в 2,8 %-ном растворе натрия цитрата — до 0—53 %. Это свидетельствует о том, что деструктивное влияние криопротекторов на состояние структуры сперматозоидов и каждого предстоящего этапа ТКС относительно предыдущего возрастает.

В этих условиях количество типичных клеток в разбавленной 3 %-ным раствором глицерина сперме снижается на 25 %; в разбавленной 15 %-ной эмульсией желтка, 9 %-ным раствором лактозы и ЗС_к — на 7—8 %. Однако следует отметить, что их количество в 6 %-ном растворе гепарина и ЗС_о снижается только на 3 %.

Таблица 2.

Относительные изменения структуры и функций сперматозоидов

Защитные среды	Этапы ТКС			Защитный эффект ТКС
	Разбавление	эквilibрация	деконсервация	
	потери типичных клеток (М, %)			остаток типичных клеток (М, %)
НС*	—	66	25	9
НС**	—	66	34	0
ВРК (1—4)	8, 25, 7, 3	4, 10, 39, 19	64, 61, 41, 65	24, 4, 13, 13
ЗС _к	7	15	33	45
ЗС _о	3	13	19	65
потери живых клеток (М, %)				остаток живых клеток (М, %)
НС*	—	66	34	М
НС**	—	66	34	М
ВРК (1—4)	8, 35, 35, 23	9, 7, 14, 13,	83, 48, 58, 63	М, 4, М, М
ЗС _к	14	15	26	45
ЗС _о	2	22	16	60
потери подвижных клеток (М, %)				остаток подвижных клеток (М, %)
НС*	—	57	43	0
НС**	—	57	43	0
ВРК (1—4)	13, 12, 6, 7	26, 38, 42, 25	61, 50, 52, 68	0, К, К, 0
ЗС _к	7	36	9	48
ЗС _о	6	14	30	50

Примечание: ВРК (1—4): 1 — желток, 2 — глицерин, 3 — лактоза, 4 — гепарин.

Сперматозоиды после этапа эквilibрации претерпевают наибольшие деструктивные изменения. Добавление к сперме в отношении 1:1 ВРК создаёт условия, в которых потери типичных клеток — наибольшие в среде с лактозой, наименьшие — с желтком. Изменения их структуры в ЗС_к и ЗС_о соответственно составляют 15 и 13 %.

Условия деконсервации существенно усугубляют процесс деструкции клеток, которая при разбавлении эмульсией желтка, а также растворами глицерина и гепарина определила наибольшие изменения в сперме. Изменениям подвергается 61—65 % клеток. Параметры изменений в неразбавленной и разбавленной сперме раствором лактозы и ЗС_к составляют 25—41 %, что в 1,4—2,4 раза меньше, однако в разбавленной ЗС_о — 19 %, что в 3,2—3,4 раза меньше.

В этой связи следует обратить внимание на то, что незащищенная и деконсервированная в цитрате сперма не обеспечивает сохранения целостности сперматозоидов. После деконсервации гранул в среде без натрия цитрата, только 9 % клеток не подвергаются деструкции. В сперме, защищенной ВРК, сохраняется до 24 % клеток без видимых изменений. Наименьшее защитное действие характерно для раствора глицерина, среднее — в лактозе и гепарине, наибольшее — в эмульсии желтка. Следует также указать на существенный защитный эффект $ЗС_k$ и $ЗС_o$. В этих средах количество клеток типичной формы после деконсервации гранул составляет соответственно 45 и 65 %.

Объективную оценку вредного влияния экзогенных факторов на сперматозоиды невозможно получить без изучения особенностей изменения их функционального состояния. Поэтому анализ изменений структуры дополняем анализом динамики потерь живых и подвижных клеток (табл. 1).

Установленные на этапах ТКС показатели их абсолютных изменений свидетельствуют о том, что лимит потерь количества живых сперматозоидов в неразбавленной сперме — высший, чем в разбавленной, а в разбавленной — больший, чем в эквilibрированной. Специфическое комплексное действие криопротекторов обуславливает характер изменений сперматозоидов деконсервированной спермы и выживание клеток. Если в неразбавленной и разбавленной растворами лактозы, гепарина и эмульсией желтка сперме не выживают сперматозоиды, то 3 %-ный раствор глицерина, $ЗС_k$ и $ЗС_o$ — сохраняют их жизнь.

Наименьшее вредное влияние на жизнеспособность сперматозоидов определили после разбавления спермы эмульсией желтка. Действие её составляющих только на 8 % уменьшает число живых клеток в сперме. В растворе гепарина этот показатель возрастает до 23%; глицерина и лактозы — до 35 %. Защитное влияние $ЗС_k$ и $ЗС_o$ на сперматозоиды различное. Если потери количества живых клеток в контрольной ЗС составляют 14 %, то в опытной — 2 %, что в 7 раз меньше. Потери живых сперматозоидов после

эквilibрации неразбавленной спермы существенные и составляют 66 %, разбавленной ВРК — 7—14 %, а разбавленной ЗС_к и ЗС_о — 15 и 22 %. После деконсервации гранул неразбавленной и разбавленной спермы эмульсией желтка, растворами лактозы и гепарина не выживает 34—83 % клеток. В то же время при использовании раствора глицерина, только 4 % сперматозоидов сохраняют жизнь (табл. 2). В этих обстоятельствах защитное действие составляющих ЗС_к и ЗС_о обеспечивает выживание 45 и 60 % клеток, что в 11 и 15 раз больше, чем у 3 %-ном растворе глицерина.

Способность сперматозоидов сохранять вне организма прямолинейное поступательное движение является базовым признаком их полноценности. Поэтому динамику изменений подвижности сперматозоидов анализируем при действии условий каждого отдельно взятого этапа ТКС (табл. 1).

Установленные абсолютные параметры изменений лимитов подвижности сперматозоидов неразбавленной, разбавленной, эквilibрированной и деконсервированной спермы составляют: 8—9, 7—8, 4—7 и 0—4 балла. Их максимальное различие для неразбавленной и разбавленной спермы определили в растворе глицерина и эмульсии желтка. В растворах лактозы, гепарина, ЗС_к и ЗС_о лимит изменений составляет 6—8 % её первичных значений.

После эквilibрации спермы подвижность клеток уменьшается на 2—5 балла. При этом минимальные 32 % изменения подвижности определили для действия раствора гепарина и ЗС_о (20 %). При действии других защитных средств потери значительные и составляют 48—57 % уровня свежеполученной неразбавленной спермы.

После деконсервации гранул неразбавленной и разбавленной спермы эмульсией желтка, а также раствором гепарина сперматозоиды теряют способность к движению. Однако в разбавленной растворами глицерина и лактозы сохраняют колебательное движение. Суммарное, комплексное защитное действие составляющих ЗС_к и ЗС_о приводит к тому, что 48 и 50 % деконсервированных сперматозоидов имеют подвижность 3,6—4,1 балла.

Поскольку изменения структуры сперматозоидов и их функций инициируют дисбаланс равновесия ионов в системе «среда-клетка», то базовым заданием работы было изучение особенностей механизма адаптации клеток к действию условий этапов ТКС (табл. 3).

Таблица 3.

Реакция сперматозоидов на действие экзогенных факторов

Этапы ТКС	Защитные среды	Способы движения ионов	Перемещённое количество (М, ±%)				
разбавление	НС*	использованный метод не позволяет определить					
	НС**						
	ВРК		2, 3, 4	Симпорт	-29, 53, 52	-28, 26, 25	-42, 52, 48
			1	Антипорт	+21	-4	-17
	3C _к		+23		-22	-36	
3C _о	+11	-21	-40				
эквilibрация	НС*	Симпорт	-2	-8	-3		
	НС**		-2	-8	-3		
	ВРК		1, 3, 4	-7, 3, 4	-30, 4, 7	-6, 1, 3	
			2	Антипорт	-23	-1	+10
	3C _к		Симпорт	-9	-1	-1	
3C _о	-10	-3		-2			
деконсервация	НС*	Симпорт	+42	+12	+35		
	НС**	Антипорт	-37	-71	+78		
	ВРК (1—4)		-40, 25, 21, 22	-1, 23, 36, 26	+229, 91, 102, 142		
			3C _к	-60	-48	+99	
	3C _о		-59	-54	+123		
ТКС (Σ условий)	НС*		Симпорт	+40	+4	+32	
	НС**	Антипорт	-39	-79	+75		
	ВРК (1—4)		-26, 77, 77, 88	-35, 52, 64, 58	+206, 59, 49, 91		
			3C _к	-46	-71	+62	
	3C _о		-58	-88	+81		

Примечание: (+) — количество перемещённых ионов из среды в клетку, (-) — из клетки в среду.

После разбавления спермы растворами глицерина, лактозы, гепарина, за исключением суспензии желтка (антипортное движение Ca²⁺ в сперматозоиды относительно K⁺ и Na⁺ из них), обнаружили симпортное движение Ca²⁺, K⁺, Na⁺ из клеток в окружающую их среду. Реакция сперматозоидов на действие 3C_к и 3C_о приблизительно такая же. В системе «среда-клетка» происходит антипортное движение Ca²⁺ в сперматозоиды

относительно K^+ и Na^+ из них. Это значит, что осмотическое давление составляющих $ЗС_k$ перемещает в клетки Ca^{2+} , количество которого в 2 раза больше, чем в $ЗС_o$, однако перемещённого в среду K^+ и Na^+ почти одинаковое.

Реакция сперматозоидов разбавленной спермы на действие условий эквипирации такая же. Обнаруженное незначительное отличие их ответа связано с количеством перемещённых ионов. Если из клеток в среду ($ВРК$, $ЗС_k$, $ЗС_o$) симпортным способом перемещается -2 — -10% Ca^{2+} , K^+ и Na^+ , то количество перемещённого в эмульсию желтка, K^+ возрастает до 30% . Исключением из правила следует считать действие раствора глицерина, который инициирует антипортное движение Na^+ в клетки относительно Ca^{2+} и K^+ из них.

Этап деконсервации гранул имеет особенный признак, суть которого в том, что в зависимости от свойств компонентов $ЗС$, перемещённый в сперматозоиды антипортным способом Na^+ вытесняет из них Ca^{2+} и K^+ . Следует отметить, что реакция клеток деконсервированных гранул $НС^*$ иная. Симпортный способ перемещения ионов увеличивает содержимое Na^+ , Ca^{2+} и K^+ в сперматозоидах. Это значит, что вредное действие дисбаланса ионов неорганических и молекул органических соединений на состояние структуры и функций сперматозоидов можно оптимизировать корректированием внедрённых в производство требований к условиям $ТКС$.

Выводы:

1. Гомеостаз Ca^{2+} , K^+ и Na^+ в сперматозоидах свежеполученной спермы высокого качества (81 — 82% клеток типичной формы, 67 — 70% живых с подвижностью 8 — 9 баллов) контролирует концентрация макроэлементов, лимиты которой составляют 2 — 3 , 7 — 9 и 14 — 22 мМ соответственно.

2. Реакцию сперматозоидов на действие водных растворов глицерина, лактозы, гепарина, за исключением суспензии желтка (антипортное движение Ca^{2+} в клетку, относительно K^+ и Na^+ из нее), представляет симпортное движение Ca^{2+} , K^+ , Na^+ из клеток в среду. Действие на клетки разбавителей спермы аналогичное, однако при действии контрольной $ЗС$, перемещённое

количество Ca^{2+} в клетки в 2 раза больше, чем при действии опытной, а K^+ и Na^+ — почти одинаковое.

3. Образованный после разбавления спермы дисбаланс ионов, за исключением раствора глицерина (антипортное движение Na^+ в клетки, относительно Ca^{2+} и K^+ из них), нормализует симпортное перемещение Ca^{2+} , K^+ , Na^+ из клеток в окружающую их среду. Условия этапа эквilibрации спермы уменьшают количество клеток типичной формы до 27—72, живых — до 23—52 %, подвижность — до 4—7 баллов.

4. Реакцию сперматозоидов на деконсервацию гранул спермы без натрия цитрата представляет симпортный способ перемещения Ca^{2+} , K^+ , Na^+ в клетки. Их реакция в растворе натрия цитрата иная. Антипортное перемещение Na^+ (+78 — +229%) в сперматозоиды, в зависимости от действия составляющих ВРК и ЗС, вытесняет из клеток Ca^{2+} (-21 — -60%) и K^+ (-1 — -71%).

5. Выравнивание гомеостаза концентраций Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , нарушенного действием условий этапов ТКС, обеспечивают симпортный и антипортный способы перемещения ионов. В момент деконсервации гранул антипортное движение Na^+ в клетки, относительно Ca^{2+} и K^+ в среду, инициирует переход сперматозоидов из состояния анабиоза в их активное движение.

Список литературы:

1. Буркат В.П. Технологія одержання сперми і способи оцінки життєздатності сперматозоїдів: метод. розробка. — Львів: Оброшино, 2006. — 42 с.
2. Максимюк Г.В. Віковий аспект співвідношень концентрацій Ca^{2+} , K^+ , Na^+ спермальної плазми і сперматозоїдів // Вісник проблем біології і медицини. 2013. — № 2 (100). — с. 83—88.
3. Максимюк Г.В. Вміст і співвідношення Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у тканинах *Organa genitalia scrotum bovina* // *Studia Biologica*. — 2010. — Т. 4. — № 2. — с. 91—96.

4. Максимюк Г.В. Співвідношення концентрацій Ca^{2+} , K^+ , Na^+ і високомолекулярних насичених неестерифікованих форм жирних кислот між спермальною плазмою і сперматозоїдами //Медична хімія. — 2007. — Т. 9. — № 3. — с. 46—49.
5. Максимюк Г.В., Воробець Д.З. Деякі аспекти взаємозв'язку концентрації сперматозоїдів в еякулятах із концентрацією Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у тканинах статевих органів і спермі //Вісник Дніпропетровського університету. Сер.: Біологія. Медицина. 2011. —Вип. 2. — Т. 1. — с. 81—87.
6. Максимюк Г.В., Воробець Д.З. Стандартизована методика визначення ступеня поліморфізму і деструкції сперматозоїдів у нативній та кріоконсервованій спермі //Вісник проблем біології і медицини. — 2011. — № 4 (90) . — с. 186—190.
7. Максимюк Г.В., Максим'юк В.М. Стандартизована методика визначення концентрації і переміщеної кількості Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у системі «клітина-середовище» //Фізика живого. — 2011. — Т. 19. — № 1. — с. 10—15.
8. Плохинский Н.А. Биометрия. — М.: МГУ, 1970. — 367 с.
9. Mortimer S.T., Chis W.M. Maxwell Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa //Reproduction. — 2004. — V. 127. — P. 285—291.
10. Sancho S., Casas I., Ekwall H. and all. Effects of cryopreservation on semen quality and the expression of sperm membrane hexose transporters in the spermatozoa of Iberian pigs //Society for Reproduction and Fertility. — 2007. — V. 134. — P. 111—121.
11. Watson P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen //Animal reproduction science. —2000. —V. 60. — P. 481—492.