

УДК 612.663/616.69-008.8:616.697:616.699+57.087
<https://doi.org/10.17816/MAJ19286>

СРАВНЕНИЕ ЦИТОМЕТРИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ НАТИВНЫХ И КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА

А.А. Доценко, М.К. Серебрякова, И.В. Кудрявцев, А.Н. Сухачев, А.В. Полевщиков

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

Для цитирования: Доценко А.А., Серебрякова М.К., Кудрявцев И.В., и др. Сравнение цитометрических методов оценки жизнеспособности нативных и криоконсервированных сперматозоидов человека // Медицинский академический журнал. – 2020. – Т. 20. – № 1. – С. 83–92. <https://doi.org/10.17816/MAJ19286>

Поступила: 05.02.2020

Одобрена: 27.02.2020

Принята: 02.03.2020

Цель исследования заключалась в сопоставлении с использованием метода проточной цитометрии способности различных сред для криоконсервации сперматозоидов обеспечивать их жизнеспособность после размораживания и оценке возможности использования лектина луковиц нарцисса ложного (*Narcissus pseudonarcissus*) для определения жизнеспособности нативных и криоконсервированных сперматозоидов человека.

Материалы и методы. Исследовали эякулят 54 мужчин в возрасте от 26 до 47 лет, проходивших лечение по поводу бесплодия. Контролем служил нативный эякулят, который также использовали для процедуры экстракорпорального оплодотворения. Четыре параллельных образца замораживали с применением различных коммерческих сред. После хранения и размораживания жизнеспособность сперматозоидов оценивали методом проточной цитометрии с помощью трех витальных красителей и меченого лектина луковиц нарцисса ложного.

Результаты. Все красители показали, что криоконсервация приводит к двукратному снижению жизнеспособности сперматозоидов, причиной которого является изменение состава и свойств поверхностного аппарата клетки, снижение потенциала ее митохондрии, повреждение акросомального комплекса и ядра. Наименьшее снижение жизнеспособности сперматозоидов было отмечено для усовершенствованной для заморозки спермы среды Квина.

Заключение. Проточная цитометрия позволяет с высокой эффективностью оценить жизнеспособность сперматозоидов в рамках проведения экстракорпорального оплодотворения. Результаты оценки жизнеспособности, полученные с применением лектина нарцисса, позволяют наиболее точно предсказать результат экстракорпорального оплодотворения.

Ключевые слова: сперматозоиды; криоконсервация; оценка жизнеспособности; проточная цитометрия; лектин нарцисса.

COMPARISON OF FLOW CYTOMETRY-BASED APOPTOSIS DETECTION METHODS FOR MEASURING OF HUMAN NATIVE AND CRYOPRESERVED SPERMATOZOIDS VIABILITY

A.A. Dotsenko, M.K. Serebriakova, I.V. Kudryavtsev, A.N. Sukhachev, A.V. Polevshchikov

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

For citation: Dotsenko AA, Serebriakova MK, Kudryavtsev IV, et al. Comparison of flow cytometry-based apoptosis detection methods for measuring of human native and cryopreserved spermatozoids viability. *Medical Academic Journal*. 2020;20(1):83-92. <https://doi.org/10.17816/MAJ19286>

Received: February 5, 2020

Revised: February 27, 2020

Accepted: March 2, 2020

The aim of the study was to compare the ability of various media for cryopreservation of sperm to ensure their viability after thawing and to assess the possibility of using *Narcissus pseudonarcissus* lectin to determine the viability of native and cryopreserved human sperm by flow cytometry.

Materials and methods. Used ejaculate 54 men aged 26 to 47 years, undergoing treatment for infertility. The control was a native ejaculate, which was also used for the *in vitro* fertilization procedure. Four parallel samples were frozen using various commercial media. After storage and thawing, spermatozoa viability was assessed by flow cytometry using three dyes and *Narcissus pseudonarcissus* lectin.

Список сокращений

ХГЧ — хорионический гонадотропин человека; ЭКО (англ. *In Vitro* Fertilization — IVF) — экстракорпоральное оплодотворение; DiOC₆(3) — йодид 3,3'-дигексилосакарбощианина; ICSI (от англ. — IntraCytoplasmic Sperm Injection) — технология интрацитоплазматического введения сперматозоида; NPA — лектин нарцисса ложного (*Narcissus pseudonarcissus*); Rh123 — родамин-123.

Results. All assays showed that cryopreservation led to a twofold decrease of sperm viability, due to the changes in the composition and properties of cell membrane, decrease in mitochondrial membrane potential, as well as the damages of acrosomal complex and nucleus. The lowest decrease in sperm viability was shown for Quinn's advantage sperm freezing medium for cryopreservation.

Conclusion. Flow cytometry makes it possible to evaluate with high efficiency sperm viability as the part of *in vitro* fertilization. The results of viability assessment using daffodil lectin make the prediction of *in vitro* fertilization outcome more accurate.

Keywords: spermatozoa; cryopreservation; viability assessment; flow cytometry; *Narcissus pseudonarcissus* lectin.

Введение

Проблема бесплодного брака становится все более актуальной в России и во всем мире. Доля мужского фактора в бесплодном браке на сегодняшний день составляет не менее 40 %. Причинами мужского бесплодия могут быть нарушения морфологии, подвижности и, как результат, оплодотворяющей способности сперматозоидов. Период жизнеспособности сперматозоидов в женском репродуктивном тракте, по разным оценкам, может достигать 3–5 дней, но оплодотворяющая способность сохраняется от нескольких часов до 1–2 дней [1]. Тем не менее именно жизнеспособность сперматозоидов зачастую определяет выбор тактики лечения мужского фактора бесплодия. Ее определение представляется наиболее значимым в случае пациентов, у которых доля прогрессивно-подвижных форм составляет менее 32 %, а также при тяжелых формах бесплодия и необходимости криоконсервации биоматериала. Важность криоконсервации обусловлена как протоколом процедуры экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), так и возрастом, состоянием здоровья пациентов, отсутствием гарантий оплодотворения и имплантации бластоцисты и другими возможными рисками, что приводит к необходимости подбора оптимальной среды для криоконсервации сперматозоидов. В свою очередь, криоконсервация сопровождается заметным снижением жизнеспособности и оплодотворяющей способности мужских гамет, что актуализирует задачу оценки жизнеспособности сперматозоидов.

В клинической практике для оценки жизнеспособности сперматозоидов человека принято придерживаться методов, рекомендуемых Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) и основанных на оценке целостности мембраны сперматозоида [2].

Чаще других используют методы, предусматривающие окрашивание внутриклеточных структур водорастворимыми красителями, либо учитывающие изменение формы и объема клетки вследствие проникновения в нее воды. Водорастворимые красители плохо проникают через мембраны неповрежденных клеток, поэтому слабо окрашивают внутриклеточные

структуры. Повышение проницаемости плазмалеммы приводит к усилению окрашивания и указывает на возможное повреждение сперматозоидов. На этом феномене основаны методы определения жизнеспособности клеток с помощью эозина, нейтрального синего и других водорастворимых красителей [2]. Этот простой и быстрый подход допускает различные модификации. Так, при одношаговом окрашивании эозин – нигрозином для окрашивания цитоплазмы используют эозин, а для увеличения контрастности между основным фоном и головками сперматозоидов – нигрозин. Это помогает визуализировать отдельные клетки. Метод также позволяет хранить предметные стекла для повторной оценки и контроля качества [3]. При этом некоторые коммерческие растворы эозина являются водными (гипотоническими) растворами, что негативно влияет на сперматозоиды, приводит к быстрому снижению жизнеспособности клеток и ложным результатам [4].

Альтернативу методам окрашивания водорастворимыми красителями для определения жизнеспособности сперматозоидов составляет тест гипосмотического набухания клеток (HOS-тест) [5]. Этот метод основан на том, что сперматозоиды с неповрежденными мембранами набухают в течение 5 мин в гипосмотическом растворе NaCl, а жгутики стабилизируются (выпрямляются) через 30 мин инкубации [6]. Данный подход полезен, когда необходимо избежать окрашивания, например, в ходе отбора сперматозоидов для проведения интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов в ооцит (процедура ICSI). При данном подходе степень набухания клетки оценивают субъективно, влажные препараты не могут храниться, что делает невозможным сравнение результатов даже для одного пациента.

Недостаток обоих методов заключается в визуальной оценке препарата и подсчете доли жизнеспособных сперматозоидов, что вносит субъективность в интерпретацию результатов и указывает на необходимость разработки современных автоматизированных и воспроизводимых методов.

Принципиально иным подходом представляется использование проточной цитометрии,

ставшей одним из наиболее распространенных методов работы с клетками как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях. Помимо высокой скорости исследования, преимуществами цитометрического анализа являются минимальный расход материала, возможность идентификации «чистой» (до 99,9 %) популяции, позитивной по тому или иному маркеру, одновременный анализ нескольких признаков и маркеров по любому числу событий, вплоть до единичных клеток. При определении жизнеспособности сперматозоидов с помощью проточной цитометрии можно одновременно учитывать как проницаемость плазмалеммы, так и состояние внутренних мембран, что позволяет параллельно оценивать митохондриальный потенциал, статус емкости и акросомальной реакции [7].

Повышение проницаемости плазмалеммы в любом случае сопряжено с изменением ее состава и частичной десикализацией, что открывает для анализа ранее скрытые детерминанты белковой и углеводной природы. Удобными инструментами для анализа углеводов гликокаликса являются лектины — углевод-связывающие белки с фиксированной лигандной специфичностью. Это определяет активное применение лектиногистохимии для изучения углеводных детерминант на поверхности клеток. Кроме того, возможно использование лектинов, конъюгированных с биотином и различными флуорохромами, в проточной цитометрии. Ранее лектины уже применяли для оценки апоптоза и связанных с ним изменений уровня различных углеводных детерминант на мембране на его разных стадиях [8, 9].

В предварительных исследованиях были выявлены важные свойства лектина луковиц нарцисса ложного (*Narcissus pseudonarcissus* — NPA), который связывает остатки маннозы в терминальном положении на поверхности клеток, что указывает на перспективность его использования для детекции апоптоза [9].

Цель данной работы заключалась в сопоставлении способности различных сред для криоконсервации сперматозоидов обеспечивать их жизнеспособность после размораживания и оценке возможности использования NPA для определения жизнеспособности нативных и криоконсервированных сперматозоидов человека методом проточной цитометрии.

Материалы и методы

Материал и его получение. В качестве материала использовали эякулят мужчин, прошедших лечение по поводу бесплодия в отделении вспомогательных репродуктивных тех-

нологий СПбГБУЗ «Городская Мариинская больница». В исследовании приняли участие 54 мужчины в возрасте от 26 до 47 лет, средний возраст составил $32,7 \pm 0,7$ года. От всех пациентов было получено осведомленное согласие. Стандартная подготовка перед получением материала включала 10-дневное исключение алкоголя, курения и тепловых процедур (бани, горячие ванны), а также 3-дневное половое воздержание. В исследование не включали пациентов, имевших эпизоды повышения температуры тела выше $37,3^\circ\text{C}$ в предшествующие 30 дней.

Материал собирали в стерильные пластиковые контейнеры и сразу после получения для всех образцов эякулята оценивали показатели спермограммы, в том числе объем материала, концентрацию сперматозоидов, долю активно-подвижных форм и другие стандартные параметры спермограммы, с использованием световой микроскопии согласно рекомендациям ВОЗ [2].

Полученный от каждого пациента материал разделяли на шесть аликвот. Нативный эякулят одной аликвоты (далее — «рабочая аликвота») подвергали стандартной обработке в рамках проведения процедуры ЭКО и использовали для оплодотворения ооцитов. После процедуры ЭКО эмбрионы переносили в полость матки женщины-реципиента, а о наступлении беременности судили по уровню хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) в крови женщины на 10-е сутки после имплантации. Уровень ХГЧ определяли методом иммуноферментного анализа по методике изготовителя наборов (НПО «Иммунотэкс», Россия). Успехом процедуры ЭКО (то есть достоверным наступлением беременности) считали повышение уровня ХГЧ более 25 мМЕ/мл на 10-е сутки после ЭКО, хотя иногда беременность наступала и при более низких сывороточных концентрациях ХГЧ на указанном сроке.

Материал аликвоты 1 (среда 1, контроль) также представлял собой нативный эякулят, который не подвергали процедуре замораживания, хранения и оттаивания, разбавляли равным объемом 0,14 М раствора натрия хлорида, забуференного фосфатами (рН 7,2–7,4, забуференный изотонический раствор натрия хлорида), и сперматозоиды отделяли от семенной плазмы путем центрифугирования при 200 g в течение 8 мин при комнатной температуре. Полученный осадок ресуспендировали в 200 мкл забуференного изотонического раствора натрия хлорида и использовали для цитометрического анализа.

Материал аликвот 2–5 (среды 2–5) замораживали в жидком азоте после добавления равного объема консервирующей среды к на-

тивному эякуляту с помощью коммерческих наборов для криоконсервации, процедуру которой осуществляли в соответствии с методикой изготовителей. Для аликвоты 2 использовали набор Sperm Freezing Medium, для аликвоты 3 — среду Квина, усовершенствованную для заморозки спермы, для аликвоты 4 — набор Freezing Medium, для аликвоты 5 — раствор Spermfreeze Solution. Замороженные порции эякулята хранили в жидком азоте от 1 до 30 сут, а после размораживания при комнатной температуре разбавляли равным объемом забуференного изотонического раствора натрия хлорида и готовили для цитометрического анализа аналогично среде 1.

Подготовка проб для проточной цитометрии и проведение анализа. Для всех образцов, находившихся в средах 1–5, параллельно применяли четыре метода оценки жизнеспособности сперматозоидов.

1. Для оценки мембранного потенциала митохондрий сперматозоидов, как самого раннего маркера апоптоза, использовали йодид 3,3'-дигексилосакарбоцианина (DiOC₆(3), Invitrogen, США). Метод окрашивания описан в работе [10]. Докрашивание иодистым пропидием и цитометрический анализ вели по методике, описанной I. Mindukshiev et al. [11].
2. Для оценки целостности мембраны и ДНК митохондрии сперматозоида и плотности упаковки его ядерного хроматина, позволяющего различить ранние и поздние стадии апоптоза, использовали краситель SYTO16 green (Invitrogen, США). Окрашивание данным красителем с последующим докрашиванием иодистым пропидием проводили в соответствии с методом, изложенным D. Wlodkowic et al. [12].
3. Для дифференцировки раннего и позднего апоптоза сперматозоидов, а также окрашивания его митохондрий и акросомального аппарата применяли липофильный краситель родамин-123 (Rh123, Sigma-Aldrich, США) с последующим докрашиванием иодистым пропидием по методике И.В. Кудрявцева и др. [13].
4. Новый способ определения жизнеспособности сперматозоидов с помощью меченого флуоресцеинизотиоцианатом лектина нарцисса (НПК «Лектинотест», Украина) защищен патентом РФ [14].

Для всех красителей в ходе цитометрического исследования анализировали не менее 50 000 одиночных клеток. С целью разделения одиночных клеток и их агрегатов использовали сочетания сигналов по прямому (FS — величина, пропорциональная размеру клеток) и боко-

вому (SS — величина, характеризующая структуру клеток) светорассеянию — интенсивность пикового против интенсивности интегрального сигналов по FS или SS, а также время прохождения через точку детекции против интенсивности интегрального сигнала FS или SS. Из-за неправильной формы сперматозоидов и возможного искажения результатов вследствие их случайной ориентации относительно лазерного луча в проточной ячейке в анализе использовали только одинаково ориентированные сперматозоиды, выделенные путем гейтирования. Результаты анализировали при помощи программного обеспечения Kaluza™ (Beckman Coulter, США).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью методов параметрического и непараметрического анализа в соответствии с результатами проверки сравниваемых совокупностей на нормальность распределения [15–18]. Накопление, корректировку, систематизацию исходной информации и визуализацию полученных результатов осуществляли с применением таблиц Microsoft Office Excel 2010. Статистический анализ проводили в программе IBM SPSS Statistics 20. В рамках параметрического анализа вычисляли средние арифметические и их ошибки ($M \pm m$), а две выборки сравнивали с использованием t -критерия Стьюдента. В ходе непараметрического анализа в качестве показателя устойчивости результатов, выраженных количественными данными для сравниваемых объектов при различных условиях, рассчитывали коэффициент конкордации (множественной ранговой корреляции) W Кендалла, значения которого интерпретировали в соответствии со шкалой Чеддока [19]. Статистическую значимость полученного коэффициента конкордации W оценивали при помощи критерия χ^2 . Любые различия в рамках параметрического и непараметрического анализа считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Результаты анализа параметров спермограммы приведены в табл. 1. Они указывают на умеренные отклонения от нормы у всех обследованных пациентов по большинству показателей. Обращает на себя внимание снижение концентрации клеток менее 20 млн/мл у 14,9 % пациентов, а также недостаток прогрессивно-подвижных сперматозоидов у 21,3 % пациентов, что не является препятствием для успешного проведения процедуры ЭКО.

Однако результаты спермограммы не дают представления о жизнеспособности сперматозоидов, которая может быть критическим

Таблица 1 / Table 1

Основные показатели спермограммы пациентов, проходивших лечение по поводу бесплодия, $n = 54$
Clinical indicators of semen analysis, $n = 54$

Показатель	Норма (2)	Значения показателя		Отклонения от нормы, %
		min – max	$M \pm m$	
Объем эякулята, мл	$\geq 1,5$	2–9	$3,6 \pm 0,2$	0,0
Концентрация клеток, млн/мл	≥ 15	3–150	$53,7 \pm 5,3$	14,9
Доля прогрессивно-подвижных форм (тип А), %	≥ 32	0–82	$42,7 \pm 3,2$	21,3
Нормальная морфология, %	≥ 4	0–20	$6,3 \pm 0,7$	36,2
Округлые клетки, млн/мл	≤ 5	0–16	$2,3 \pm 0,6$	7,3

Таблица 2 / Table 2

Результаты оценки жизнеспособности нативных и криоконсервированных сперматозоидов по результатам цитометрического исследования, доля жизнеспособных сперматозоидов от общего числа клеток в % ($M \pm m, n \geq 50$) по каждой точке

Effects of cryopreservation on sperm viability (the quantitative data (% with total cells) are represented as Mean \pm SEM)

Среда	Краситель				W'	$p_{W'}$
	DiOC ₆ (3)	SYTO16	Rh123	NPA		
1	$53,6 \pm 2,1$	$54,4 \pm 2,3$	$53,1 \pm 2,4$	$51,5 \pm 2,7$	0,234	<0,001
2	$22,5 \pm 1,6$	$20,8 \pm 1,7$	$19,9 \pm 1,7$	$19,6 \pm 1,7$	0,086	<0,01
3	$24,9 \pm 1,7$	$24,5 \pm 1,9$	$24,2 \pm 1,9$	$23,4 \pm 1,9$	0,072	<0,01
4	$15,0 \pm 1,6$	$12,2 \pm 1,4$	$11,6 \pm 1,4$	$12,2 \pm 1,4$	0,103	<0,001
5	$23,5 \pm 1,6$	$21,9 \pm 1,6$	$21,0 \pm 1,7$	$21,4 \pm 1,6$	0,075	<0,01
W'	0,722	0,755	0,752	0,790	–	–
$p_{W'}$	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	–	–

Примечание. Значения коэффициента конкордации Кендалла: W' — для красителя (столбец таблицы), $p_{W'}$ — его достоверность; W'' — для среды (строка таблицы), $p_{W''}$ — его достоверность.

фактором для оплодотворения. На жизнеспособность клеток может существенно влиять процедура криоконсервации материала. Для оценки жизнеспособности нативных сперматозоидов и клеток после криоконсервации использовали метод проточной цитометрии с окрашиванием материала тремя разными флуоресцентными красителями — DiOC₆(3), SYTO16, Rh123 и меченным флуоресцеинизотиоцианатом NPA. Результаты оценки приведены в табл. 2.

Согласно приведенным в табл. 2 результатам лишь половину сперматозоидов в эякуляте пациентов с мужским бесплодием можно рассматривать как полноценные живые клетки даже в случае нативного материала (контрольная среда 1), у остальных клеток отмечаются признаки апоптоза. Этот результат получен при использовании всех красителей, что подтверждает его надежность. Снижение жизнеспособности затрагивает энергетический аппарат клетки (краситель DiOC₆(3), на 46,4 %), плотность упаковки хроматина в ядре (краситель SYTO16, на 45,6 %), акросомальный комплекс (краситель

Rh123, снижение на 46,9 %) и состояние поверхностного аппарата сперматозоида, включая его распознающий аппарат (краситель NPA, на 48,5 %). Сходство показателей, полученных с применением разных красителей, подтверждается высокой однородностью значений, что отражает достоверность показателя W' , равного 0,234 ($p < 0,001$).

Данные таблицы также свидетельствуют, что при любой схеме консервации сперматозоидов их жизнеспособность после размораживания снижается в 2–4 раза. При использовании среды 3 жизнеспособность сперматозоидов снижается в 2 раза, при использовании среды 4 — практически в 4 раза. В случае применения сред 2 и 5 получен промежуточный показатель снижения жизнеспособности мужских гамет относительно сред 3 и 4. Согласно показателю конкордации Кендалла W'' эти результаты также носят высокодостоверный характер для каждой криоконсервирующей среды ($p < 0,01$ и менее).

Снижение жизнеспособности в ходе криоконсервации не связано напрямую ни с одним

из рассматриваемых признаков раннего апоптоза, выявляемых с помощью набора описанных выше красителей, на что указывают равномерно высокий показатель W Кендалла для всех красителей, высокая плотность и достоверность значений (для всех красителей $p < 0,001$). При этом следует учитывать, что столь большие значения W (от 0,722 для DiOC₆(3) до 0,790 для NPA) являются следствием прямого сопоставления результатов для нативного контроля (среда 1) и клеток, прошедших процедуру криоконсервации (среды 2–5). Это обуславливает группировку данных вокруг их средних значений и обеспечивает высокую достоверность распределения.

Как отмечено выше, рабочая аликвота была использована в ходе процедуры ЭКО, что позволило ретроспективно сопоставить результаты оценки жизнеспособности нативных сперматозоидов (среда 1) с результатами процедуры ЭКО (без применения технологии ICSI). Результаты анализа с применением панели красителей приведены в табл. 3. Однозначным критерием наступления беременности считали повышение уровня ХГЧ в сыворотке крови женщины более 25 мМЕ/мл через 10 сут после проведения ЭКО, хотя в ряде случаев беременность наступала и при более низких сывороточных уровнях ХГЧ.

Результаты, приведенные в табл. 3, показывают, что достоверное наступление беременности после ЭКО связано с относительно высокой (более 65 % по всем методам оценки) жизнеспособностью сперматозоидов. При этом наивысший уровень жизнеспособности гамет (в среднем $70,0 \pm 2,4$ % при максимальном индивидуальном значении 80,4 % живых клеток) зафиксирован при окрашивании NPA; показатель достоверно отличался от

уровней жизнеспособности клеток, выявленных при помощи других красителей (согласно t -критерию Стьюдента). Таким образом, можно заключить, что NPA позволяет оценить не только жизнеспособность сперматозоидов, но и их оплодотворяющую способность. Высокая эффективность оплодотворения также связана с выраженным окрашиванием красителем DiOC₆(3) ($66,3 \pm 3,1$ % живых клеток). При этом доля живых клеток, выявленная с помощью Rh123 и SYTO16, несколько ниже, хотя достоверно не отличается от показателей жизнеспособности сперматозоидов, выявленных с помощью DiOC₆(3) (см. табл. 3).

Сывороточные уровни ХГЧ менее 25 мМЕ/мл в крови женщины через 10 сут после ЭКО не позволяют сделать однозначного заключения о наступлении беременности. Данные табл. 3 также свидетельствуют, что в этих случаях показатели жизнеспособности сперматозоидов были заметно ниже и ни один из методов оценки жизнеспособности сперматозоидов не обладал прогностическим значением в отношении их оплодотворяющей способности.

Результаты табл. 3 подтверждаются данными, полученными при применении технологии ICSI в ходе ЭКО (табл. 4). Технология ICSI предусматривает введение сперматозоида непосредственно в цитоплазму ооцита путем микроинъекции. В этом случае состояние поверхностного аппарата сперматозоида, его митохондрии, а также акросомального комплекса теряет решающее значение для процесса оплодотворения.

Из табл. 4 видно, что при любом способе оценки жизнеспособности сперматозоида она ниже аналогичного показателя, представленного в табл. 3. Более того, между показателями, полученными с применением разных

Таблица 3 / Table 3

Сопоставление уровней жизнеспособности нативных сперматозоидов (по результатам использования различных красителей) с наступлением беременности после процедуры экстракорпорального оплодотворения
Comparison of the viability levels of native sperm (according to the results of using various dyes) with the onset of pregnancy after the IVF procedure

Краситель	Уровень хорионического гонадотропина человека в сыворотке женщины				p
	менее 25 мМЕ/мл, n = 14		25 мМЕ/мл и более, n = 5		
	M ± m	M ± σ	M ± m	M ± σ	
DiOC ₆ (3)	62,3 ± 2,8	56,3–68,3	66,3 ± 3,1	57,6–75,0	>>0,05
SYTO16	64,7 ± 2,7	59,0–70,4	65,0 ± 2,9	51,4–78,6	>>0,05
Rh123	65,1 ± 2,6	59,6–70,6	65,4 ± 2,3	53,3–77,5	>>0,05
NPA	62,4 ± 2,8	56,3–68,5	70,0 ± 2,4	59,6–80,4	<0,05

Примечание. $M \pm \sigma$ — 95 % доверительный интервал, где σ — среднее квадратичное отклонение; достоверность различий между распределениями образцов (относительно 95 % интервала) по жизнеспособности сперматозоидов при уровнях хорионического гонадотропина человека выше и ниже 25 мМЕ/мл сравнивали по критерию χ^2 .

Сопоставление уровней жизнеспособности нативных сперматозоидов (по результатам использования различных красителей) с наступлением беременности после процедуры экстракорпорального оплодотворения по технологии ICSI
Comparison of the viability levels of native sperm (according to the results of using various dyes) with the onset of pregnancy after an IVF procedure using ICSI technology

Краситель	Уровень хорионического гонадотропина человека в сыворотке женщины				p
	менее 25 мМЕ/мл, n = 14		25 мМЕ/мл и более, n = 12		
	M ± m	M ± σ	M ± m	M ± σ	
DiOC ₆ (3)	53,6 ± 3,4	46,3–61,0	43,9 ± 3,7	35,7–52,1	>0,05
SYTO16	54,2 ± 4,6	44,2–64,3	45,5 ± 3,6	37,7–53,3	>0,05
Rh123	51,8 ± 4,5	41,9–61,7	43,0 ± 4,3	33,5–52,5	>0,05
NPA	50,4 ± 5,0	39,4–61,3	41,0 ± 5,4	28,7–53,2	>0,05

Примечание. См. табл. 3.

красителей, не существует достоверных различий ни в одном случае. Еще одним заметным отличием результатов, полученных при применении технологии ICSI, является высокая вероятность наступления беременности (и сопутствующий ей высокий уровень ХГЧ в крови женщины) при более низкой (в среднем на 10 %) жизнеспособности сперматозоидов.

Обсуждение

Проточную цитометрию широко используют для изучения сперматозоидов млекопитающих в области клинической андрологии, репродуктивной токсикологии и ветеринарии. Ее преимущество заключается не только в объективности автоматизированного учета и его высочайшей скорости, но и в множественности параметров, определяемых в ходе анализа. Такой комплексный подход может способствовать повышению предсказательной силы статуса фертильности и улучшению качества как криорезистентности, так и всей процедуры ЭКО.

С помощью всех приведенных способов оценки жизнеспособности сперматозоидов человека в рамках метода проточной цитометрии получены сходные результаты. При этом нельзя не обратить внимания, что при окрашивании меченым NPA зафиксирован самый низкий уровень жизнеспособности по сравнению с тремя другими красителями (DiOC₆(3), SYTO16 и Rh123) (см. табл. 2). Тем не менее именно с использованием NPA для оценки жизнеспособности нативных клеток (среда 1) было достигнуто самое высокое совпадение результатов по уровню оплодотворяющей способности сперматозоидов и наступлению беременности (см. табл. 2 и 3). По-видимому, это объясняется разным функциональным значением для жизнеспособности и фертильности сперматозоидов

тех структур, которые связываются с различными красителями. Так, NPA, специфичный к αD-маннозе, определяет состояние поверхностного аппарата клетки, что применительно к сперматозоидам указывает на состояние распознающего аппарата гаметы, который играет центральную роль в оплодотворении в физиологических условиях и в ходе процедуры ЭКО (без модификации ICSI).

Почти одинаковое значение для фертильности клеток имеет состояние митохондрии и акросомального аппарата сперматозоида (красители DiOC₆(3) и Rh123) и наименьшее значение — состояние мембраны ядерной оболочки и ДНК (краситель SYTO16). Именно в такой последовательности можно выстроить разные способы цитометрической оценки жизнеспособности нативных сперматозоидов по их прогностическому значению для успеха оплодотворения (см. табл. 2 и 3), которое полностью совпадает с последовательностью событий в ходе физиологического слияния гамет [20].

Это заключение подтверждается данными табл. 4. Поскольку по технологии ICSI спермий вводится путем микроинъекции непосредственно в цитоплазму ооцита, состояние его поверхностного распознающего аппарата, равно как и полноценность работы акросомы и митохондрии в шейке, теряет свое критическое значение. В пользу именно этого заключения свидетельствуют результаты оценки жизнеспособности сперматозоидов, использованных для ICSI: все красители указывают на одинаково низкий уровень жизнеспособности сперматозоидов. Однако низкая жизнеспособность сперматозоидов слабо связана с успехом ЭКО методом ICSI и наступлением беременности. Тем не менее, оценка жизнеспособности сперматозоидов актуальна и в этом случае.

Криоконсервирование сперматозоидов составляет неотъемлемую часть вспомогательных

репродуктивных технологий, и прогнозирования результатов криоконсервации необходимо при лечении мужского фактора бесплодия и создании донорских банков спермы. В настоящее время стандартным обследованием перед замораживанием материала является оценка подвижности, концентрации и морфологии сперматозоидов [2], хотя данные параметры не имеют прогностического значения в отношении успеха криорезистентности и сохранения жизнеспособности после замораживания, так как не позволяют оценить степень функционально значимых изменений в плазматической мембране, акросоме, митохондриях или ДНК. Предполагают, что результат процедуры криоконсервации во многом зависит от первоначальной лабильности мембраны нативного сперматозоида, то есть от состояния его поверхностного аппарата [21, 22]. Повреждение плазматической мембраны в ходе криоконсервации происходит достаточно часто по сравнению с повреждением акросомы, но одновременно может повреждаться и митохондриальная мембрана, что приводит к уменьшению синтеза АТФ. Все это приводит к снижению доли прогрессивно-подвижных сперматозоидов после криоконсервации, которая в норме составляет около 50 %.

В ходе исследования для криоконсервации сперматозоидов использовали четыре коммерческие среды (среда 2 — Sperm Freezing Medium, среда 3 — усовершенствованная для заморозки спермы среда Квина, среда 4 — набор Freezing Medium и среда 5 — раствор Spermfreeze Solution). На основании приведенных данных видно, что в любом случае процедура криоконсервации снижает жизнеспособность мужских гамет в среднем в 2 раза по сравнению с нативными клетками. Приведенные в табл. 2 результаты позволяют утверждать, что усовершенствованная для заморозки среда Квина обеспечивает несколько лучшую сохранность клеток, в то время как максимально травматичным для сперматозоидов было использование набора Freezing Medium. Однако не только при использовании различных консервирующих сред, но вообще после процедуры криоконсервации необходимо оценивать жизнеспособность сперматозоидов, при этом NPA обеспечивает получение результатов, наилучшим образом коррелирующих с высокой фертильностью клеток.

В любом случае результаты исследования не указывают на причины развития мужского бесплодия у конкретного пациента. Эти причины могут быть следствием множества внешних (инфекционно-воспалительные заболевания, механические травмы, токсические воздействия и др.) и внутренних (нарушения развития

пациента, многочисленные физиологические, в том числе гормональные, иммунологические, обменные сдвиги, окислительный стресс) факторов. Однако цитометрическая оценка жизнеспособности сперматозоидов способна существенно повысить эффективность лечения мужского бесплодия в рамках применения ЭКО.

Выводы

1. Цитометрическая оценка жизнеспособности сперматозоидов превосходит традиционные микроскопические методы как по информативности, так и по скорости анализа.
2. Разные способы цитометрической оценки жизнеспособности сперматозоидов по уровню апоптоза с использованием красителей DiOC₆(3), SYTO16, Rh123 и меченного флуоресцеинизотиоцианатом NPA дают сходные результаты. Однако показатели, полученные с использованием NPA, лучше всего соответствуют оплодотворяющей способности клеток и частоте наступления беременности в случае ЭКО без применения технологии ICSI.
3. В ходе криоконсервации жизнеспособность сперматозоидов снижается примерно в 2 раза. Усовершенствованная для заморозки спермы среда Квина оказывает наименьшее повреждающее действие на сперматозоиды по сравнению с тремя другими средами.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update*. 2006;12(1):23-37. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi047>.
2. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: WHO; 2010. 287 p.
3. Björndahl L, Söderlund I, Kvist U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum Reprod*. 2003;18(4):813-816. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg199>.
4. Björndahl L, Söderlund I, Johansson S, et al. Why the WHO recommendations for eosin-nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change. *J Androl*. 2004;25(5):671-678. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02839.x>
5. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*. 1984;70(1):219-228. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219>.

6. Hossain AM, Rizk B, Barik S, et al. Time course of hypo-osmotic swellings of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes. *Hum Reprod.* 1998;13(6):1578-1583. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.6.1578>.
7. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. — Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2018. [Zurochka AV, Khaydukov SV, Kudryavtsev IV, Chereshev VA. Protophnaya tsitometriya v biomeditsinskikh issledovaniyakh. Ekaterinburg: RIO UrO RAN; 2018. (In Russ.)]
8. Batisse C, Marquet J, Greffard A, et al. Lectin-based three-color flow cytometric approach for studying cell surface glycosylation changes that occur during apoptosis. *Cytometry A.* 2004;62(2):81-88. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20094>.
9. Серебрякова М.К., Доценко А.А., Кудрявцев И.В., Полевщиков А.В. Скрининг панели лектинов для оценки стадий апоптоза тимоцитов мыши // Медицинский академический журнал. — 2019. — Т. 19. — № 3. — С. 57–70. [Serebriakova MK, Dotsenko AA, Kudryavtsev IV, Polevshchikov AV. Lectin panel screening for evaluating of murine thymocytes apoptosis stages. *Medical academic journal.* 2019;19(3):57-70. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/MAJ19357-70>.
10. Castedo M, Ferri K, Roumier T, et al. Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis. *J Immunol Methods.* 2002;265(1-2):39-47. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(02\)00069-8](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(02)00069-8).
11. Mindukshev I, Kudryavtsev I, Serebriakova M, et al. Chapter 24 – Flow cytometry and light scattering technique in evaluation of nutraceuticals. In: *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity.* Elsevier; 2016. P. 319-332. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802147-7.00024-3>.
12. Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. SYTO probes in the cytometry of tumor cell death. *Cytometry A.* 2008;73(6):496-507. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20535>.
13. Кудрявцев И.В., Головкин А.С., Зурочка А.В., Хайдуков С.В. Современные методы и подходы к изучению апоптоза в экспериментальной биологии // Медицинская иммунология. — 2012. — Т. 14. — № 6. — С. 461–482. [Kudryavtsev IV, Golovkin AS, Zurochka AV, Khaidukov SV. Modern technologies and approaches to apoptosis studies in experimental biology. *Medical Immunology (Russia).* 2012;14(6):461-482. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2012-6-461-482>.
14. Патент РФ на изобретение № 2689791/ 29.05.18. Доценко А.А., Кудрявцев И.В., Серебрякова М.В., Полевщиков А.В. Способ определения жизнеспособности сперматозоидов человека. [Patent RUS No 2689791/ 29.05.18. Dotsenko AA, Kudryavtsev IV, Serebryakova MV, Polevshchikov AV. Sposob opredeleniya zhiznesposobnosti spermatozoidov cheloveka. (In Russ.)]
15. Glantz SA. *Primer of Biostatistics.* 7th ed. New York: McGraw-Hill; 2011.
16. Petri A, Sabin C. *Medical statistics at a glance* 3rd ed. London: Wiley-Blackwell; 2013.
17. Плавинский С.Л. Биостатистика: планирование, обработка и представление результатов биомедицинских исследований при помощи системы SAS. — СПб.: СПбМАПО, 2005. [Plavinskiy SL. Biostatistika: planirovanie, obrabotka i predstavlenie rezul'tatov biomeditsinskikh issledovaniy pri pomoshchi sistemy SAS. Saint Petersburg: SPbMAPO; 2005. (In Russ.)]
18. Зайцев В.М., Лифляндский В.Г., Маринкин В.И. Прикладная медицинская статистика. — М.: Фолиант, 2006. [Zaytsev VM, Lifyandskiy VG, Marinkin VI. Prikladnaya meditsinskaya statistika. Moscow: Foliant, 2006. (In Russ.)]
19. Наследов А.Д. SPSS 19: профессиональный статистический анализ данных. — СПб.: Питер, 2011. [Nasledov AD. SPSS 19: professional'nyy statisticheskiy analiz dannykh. Saint Petersburg: Piter; 2011. (In Russ.)]
20. Aitken RJ, Gibb Z, Mitchell LA, et al. Sperm motility is lost in vitro as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols. *Biol Reprod.* 2012;87(5):110. <https://doi.org/10.1095/biol-reprod.112.102020>.
21. Castro LS, Hamilton TRS, Mendes CM, et al. Sperm cryo-damage occurs after rapid freezing phase: flow cytometry approach and antioxidant enzymes activity at different stages of cryopreservation. *J Anim Sci Biotechnol.* 2016;7:17. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0076-x>.
22. Duru NK, Morshedi M, Schuffner A, Oehninger S. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidylserine. *Fertil Steril.* 2001;75(2):263-268. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)01694-0](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)01694-0).

Сведения об авторах / Information about the authors

Анна Андреевна Доценко — соискатель отдела иммунологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; руководитель лаборатории клинической эмбриологии Отделения вспомогательных репродуктивных технологий, СПбГБУЗ «Городская Мариинская больница», Санкт-Петербург, Россия. E-mail: annadotsenkoem@gmail.com.

Мария Константиновна Серебрякова — научный сотрудник отдела иммунологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0003-2596-4220>. SPIN-code: 3332-8732. E-mail: m-serebryakova@yandex.ru.

Anna A. Dotsenko — applicant, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; Head of the Clinical Embryology Laboratory, Department of Assisted Reproductive Technologies, City Mariinsky Hospital, Saint Petersburg, Russia. E-mail: annadotsenkoem@gmail.com.

Maria K. Serebriakova — Researcher, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0003-2596-4220>. SPIN-code: 3332-8732. E-mail: m-serebryakova@yandex.ru.

Игорь Владимирович Кудрявцев — канд. биол. наук, заведующий лабораторией иммунорегуляции, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0001-7204-7850>. SPIN-код: 4903-7636. E-mail: igorek1981@yandex.ru.

Александр Николаевич Сухачев — канд. биол. наук, научный сотрудник отдела иммунологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0002-3458-2331>. SPIN-код: 8704-3466. E-mail: 3606940@mail.ru.

Александр Витальевич Полевщиков — д-р биол. наук, профессор, заведующий отделом иммунологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0002-3342-178X>. SPIN-код: 9627-6694. E-mail: ALEXPOL512@yandex.ru.

Igor V. Kudryavtsev — PhD, Head of Immunoregulation Laboratory, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0001-7204-7850>. SPIN-code: 4903-7636. E-mail: igorek1981@yandex.ru.

Alexander N. Sukhachev — PhD, Researcher, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-3458-2331>. SPIN-code: 8704-3466. E-mail: 3606940@mail.ru.

Alexander V. Polevshchikov — PhD, D.Sci.Biol., Professor, Head of the Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-3342-178X>. SPIN-code: 9627-6694. E-mail: ALEXPOL512@yandex.ru.

✉ **Контактное лицо / Corresponding author**

Александр Витальевич Полевщиков / Alexander V. Polevshchikov
E-mail: ALEXPOL512@yandex.ru