

## Криоконсервация единичных сперматозоидов

Д.А. ИСАЕВ<sup>1,2</sup>, С.Ю. ЗАЛЕТОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Медицинская клиника репродукции МА-МА (isaev@ma-ma.ru); <sup>2</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

Предлагается методика криоконсервации единичных сперматозоидов в искусственных микросферах из агарозного геля. Агароза нетоксична, биологически инертна и не провоцирует акросомной реакции. После криоконсервации в микросферах из агарозы и последующего размораживания 64% сперматозоидов восстановили подвижность.

**Ключевые слова:** единичные сперматозоиды, криоконсервация, агарозные микросферы, ICSI.

Широкое внедрение методики ICSI в клиническую эмбриологию в начале 90-х годов XX века позволило проводить фертилизацию единичными сперматозоидами пациентов с криптозооспермией, а также эпидидимальными и тестикулярными сперматозоидами или элонгированными сперматидами, полученными хирургическим путем от пациентов с азооспермией [1]. Количество пригодных к фертилизации подвижных морфологически нормальных сперматозоидов может оказаться исчезающе малым, а их выделение из больших объемов эякулятов и тканевых биоптатов процесс очень трудоемкий и требует больших затрат времени. В случае высокого риска повторного неполучения этого уникального генетического материала или физической невозможности его получения в последующих программах ВРТ требуется криоконсервация выделенных единичных сперматозоидов.

Основная проблема сохранения индивидуальных сперматозоидов состоит в том, что в процессе криоконсервации и подготовки к непосредственному использованию они могут быть утрачены даже в небольших, порядка нескольких микролитров, объемах. Решить эту проблему позволяют микроконтейнеры. Физически локализуя объект в большем объеме, микроконтейнеры значительно упрощают и облегчают манипуляции, связанные с обработкой криопротекторами, размораживанием и поиском сперматозоидов при оплодотворении путем ICSI.

В настоящее время криоконсервация единичных сперматозоидов в микроконтейнерах не является распространенной практикой в клинической эмбриологии. Одним из условий ее успешного внедрения является наличие постоянного и легкодоступного источника микроконтейнеров, которые в полной мере отвечали бы своему предназначению.

В 1997 г. J. Cohen и соавт. [2] предложили методику криоконсервации единичных спермато-

зоидов в пустых *zonae pellucidae* (ZP) ооцитов человека и лабораторных животных — мыши и хомячка. Источником ZP человека могут быть незрелые, не оплодотворившиеся или аномально оплодотворившиеся ооциты, аномальные и погибшие ранние зародыши. Согласно методике, клеточное содержимое эвакуируют при помощи микропипетки, затем инъецируют сперматозоиды в полость полученного таким способом микроконтейнера аналогично процедуре ICSI (рис. 1, А). Содержащие сперматозоиды ZP переносят в раствор криопротекторов под контролем бинокулярной лупы, а затем помещают в необходимых количествах в соломины для криоконсервации вместе с раствором. Соломины замораживают в соответствии с выбранным режимом и помещают в жидкий азот на хранение. После размораживания сперматозоиды извлекают путем механического или биохимического разрушения ZP. По данным авторов, в среднем 82% сперматозоидов после криоконсервации сохраняли подвижность. Потери сперматозоидов на разных стадиях и в зависимости от способа выделения варьировали от 10 до 37%. Средняя частота фертилизации подверженными криоконсервации в ZP сперматозоидами составила 51,5% и достоверно не отличалась от частоты фертилизации «свежими» сперматозоидами тех же пациентов. Отмечено, что потери сперматозоидов после размораживания за счет связывания с ZP могут быть обусловлены наличием видоспецифических рецепторов/лигандов, поэтому использование ZP животных может быть предпочтительнее [2].

Напротив, полагая, что связывание сперматозоидов с ZP обусловлено неполным удалением клеточного содержимого, Y. Hsieh и соавт. [3] модифицировали методику J. Cohen и соавт. [2], сделав ее, по собственному утверждению, более простой и эффективной. Усовершенствования методики состояли в том, что для эвакуации содержимого авторы использовали микропипетки



4—8 мкм (а не 15 мкм), после эвакуации содержимого деформированные ZP помещали в 10% глицерин, где они расправлялись, а для инъекции сперматозоидов не использовали поливинилпирролидон [3]. За исключением этих несомненно полезных технических дополнений, в целом, методика криоконсервации сперматозоидов в ZP не претерпела значительных усовершенствований. По данным этих исследователей, потери сперматозоидов и восстановление подвижности после размораживания не различаются при использовании ZP человека и мыши [4].

Ранее М. Montag и соавт. предложили проделывать отверстия в ZP при помощи диодной лазерной пушки для последующей эвакуации клеточного содержимого микропипеткой диаметром 10—15 мкм [5]. Следует заметить, что подвижные сперматозоиды легко могут покинуть ZP через отверстие, поэтому прокол инъекционной иглой, по-видимому, более предпочтителен, так как не требует специального закрывания отверстия при помощи капельки минерального масла.

Р. Levi-Setti и соавт. заполняли пустые ZP человеческих ооцитов желточным буфером, затем инъецировали в них сперматозоиды пациентов с криптозооспермией. После размораживания 73% сперматозоидов восстановили подвижность, потери сперматозоидов при выделении составляли 41% [6].

А. Borini и соавт. сообщают о результатах криоконсервации единичных подвижных сперматозоидов, полученных путем TESA, в ZP человека. После размораживания 27% сперматозоидов сохранили подвижность, потери при выделении составили около 12%. Частота фертилизации методом ICSI для подвижных сперматозоидов составила 23% (3/13); у 8 ооцитов, инъецированных неподвижными сперматозоидами, оплодотворения не произошло [7].

Улучшить подвижность тестикулярных сперматозоидов и, следовательно, повысить частоту

фертилизации позволяет их предварительное культивирование в течение 2—3 сут [8, 9]. J. Liu и соавт. продемонстрировали возможность эффективной криоконсервации в ZP мыши единичных тестикулярных сперматозоидов после предварительного культивирования в течение 3 сут. Сохранение подвижности после криоконсервации «свежих» (77%) и предварительно культивированных (74%) тестикулярных сперматозоидов не различалось достоверно [10].

Несмотря на то что ZP являются идеальными микроконтейнерами, их использование связано с риском инфицирования и контаминации чужеродным генетическим материалом, а также с нежелательной в данном случае способностью сперматозоидов связываться с их поверхностью и провоцировать акросомную реакцию. Подготовка таких контейнеров требует микрохирургических манипуляций по удалению содержимого, что значительно усложняет методику.

Поиск других микроконтейнеров биогенного происхождения лишь отчасти решает проблемы биологической безопасности и наличия доступного и постоянного источника. В этом плане заслуживает внимания оригинальная работа А. Just и соавт. [11], к сожалению, не получившая продолжения. Эти исследователи использовали в качестве микроконтейнеров для криоконсервации единичных сперматозоидов колониальную зеленую жгутиковую водоросль *Volvox globator*, которую можно поддерживать в культуре (рис. 1, Б). Сферические колонии этой водоросли диаметром 0,1—1,0 мм состоят из 1500—20 000 погруженных в слизистые капсулы клеток, связанных между собой цитоплазматическими мостиками и расположенных по периферии сферы. Источником единичных сперматозоидов служили эякуляты пациентов с тяжелой олигозооспермией (менее 100 подвижных сперматозоидов в 1 мл). Примерно 63% сперматозоидов после размораживания сохранили подвижность. Такие микро-

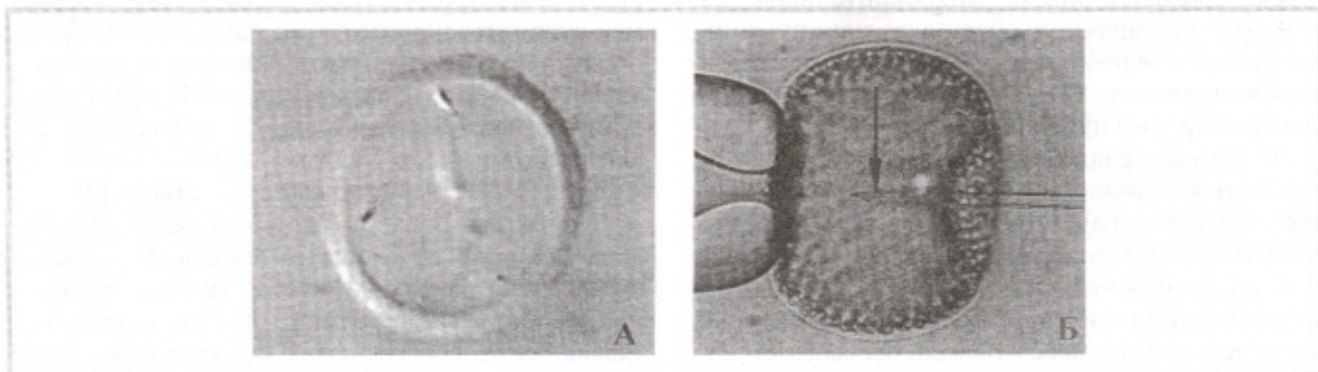


Рис. 1. Природные микроконтейнеры для криоконсервации единичных сперматозоидов.

А — zona pellucida мыши с двумя сперматозоидами внутри [2];

Б — инъекция сперматозоида в полость водоросли *Volvox globatar* [11].



контейнеры обладают рядом очевидных преимуществ по сравнению с ZP млекопитающих: они не провоцируют акросомной реакции, менее инфекционно опасны, зеленые сферические водоросли хорошо видны и удобны для манипуляций с использованием бинокулярной лупы. Несмотря на это, авторы не исключали потенциальной биологической опасности таких микроконтейнеров и не использовали сохраненные сперматозоиды в репродуктивных процедурах [11].

Альтернативным путем получения микроконтейнеров может стать их искусственное изготовление. Это позволит использовать сертифицированные для медицинских целей вещества и материалы и избежать таким способом потенциальных препятствий для внедрения в клиническую практику.

Одним из способов решения проблемы биологической безопасности микроконтейнеров для криоконсервации является микрокапсулирование. Капсулирование спермы в полимеризующейся в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  альгиновой кислоте используется для сохранения спермы сельскохозяйственных животных уже более 20 лет [12]. Недавно А. Hettler и соавт. оптимизировали этот метод для криоконсервации небольших количеств сперматозоидов в микрокапсулах объемом 10 мкл. Малые объемы спермы смешивают с альгиновой кислотой до необходимой концентрации последней, а затем капают в раствор  $\text{CaCl}_2$ , где в течение короткого времени происходит полимеризация альгината в поверхностном слое микрокапли. Такие микрокапсулы, содержащие несколько сперматозоидов, могут быть заморожены в стандартных соломинах для криоконсервации объемом 250 мкл. После размораживания эти микрокапсулы помещают в раствор цитрата натрия, где происходит плавление микрокапсул и высвобождение сперматозоидов. По данным этих авторов, сохранение жизнеспособности и подвижности сперматозоидов после криоконсервации в альгинатных микрокапсулах сравнимо с результатами применения стандартных методик, а потери отсутствуют [13]. Несмотря на очевидные преимущества, такой метод является не более чем эффективным способом разделения материала на малые аликвоты, поскольку данная техника микрокапсулирования не позволяет производить манипуляции с индивидуальными сперматозоидами.

К аналогичным способам решения проблем постоянства источника и биологической безопасности следует, по-видимому, отнести криоконсервацию малых количеств сперматозоидов в криопетлях [14, 15] или малых (0,5—1,0 мкл) объемах [16]. Помещение в малый объем или криопетлю индивидуальных сперматозоидов с исполь-

зованием техники ICSI требует исключительных навыков, что, очевидно, не снижает риск утраты уникального объекта.

В настоящей работе мы предлагаем новый метод криоконсервации единичных сперматозоидов в разработанных нами искусственных полых микросферах из агарозного геля.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для криоконсервации единичных сперматозоидов или небольших количеств сперматозоидов использованы разработанные и изготовленные нами полые микросферы из 2% агарозного геля диаметром ~100 мкм.

Интактные подвижные сперматозоиды инъецировали в агарозные микросферы в количестве от 1 до 10, используя методику, оборудование и расходные материалы для ICSI (рис. 2). Микросферы со сперматозоидами помещали в 1:1 Sperm Preparation Medium (MediCult, Дания, Cat.No.1069/1070) и Sperm Freezing Medium (MediCult, Дания, Cat.No.10670005/10670010). Спустя 5 мин микросферы набирали в соломину для криоконсервации объемом 250 мкл (Biovet, Франция) и замораживали в течение 10 мин в парах жидкого азота, после чего погружали непосредственно в жидкий азот на 30 мин. Размораживание проводили на воздухе (25°C), затем микросферы отмывали в 5·100 мкл каплях Sperm Preparation Medium и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Жизнеспособность сперматозоидов после размораживания оценивали по сохранению подвижности. Дополнительно проводили суправитальное окрашивание эозином в качестве теста на целостность клеточной мембраны.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве материала для изготовления микросфер мы использовали агарозу. Последняя относится к полиуроновым кислотам, это полисахарид, состоящий из D-галактозы и 3,6-ангидро-L-галактозы; она биологически инертна и нетоксична для гамет и эмбрионов человека. Агарозный гель (студень) упругий, проницаемый, в тонком слое достаточно прозрачен, по биохимической структуре и физическим свойствам подобен ZP яйцеклеток млекопитающих. Поскольку ZP животных и человека являются наилучшими микроконтейнерами для криоконсервации, искусственные микросферы из агарозы, очевидно, являются их более доступным и лишенным ряда недостатков аналогом.

При получении нами искусственных микросфер используются только два компонента — биологически инертная агароза и деионизован-



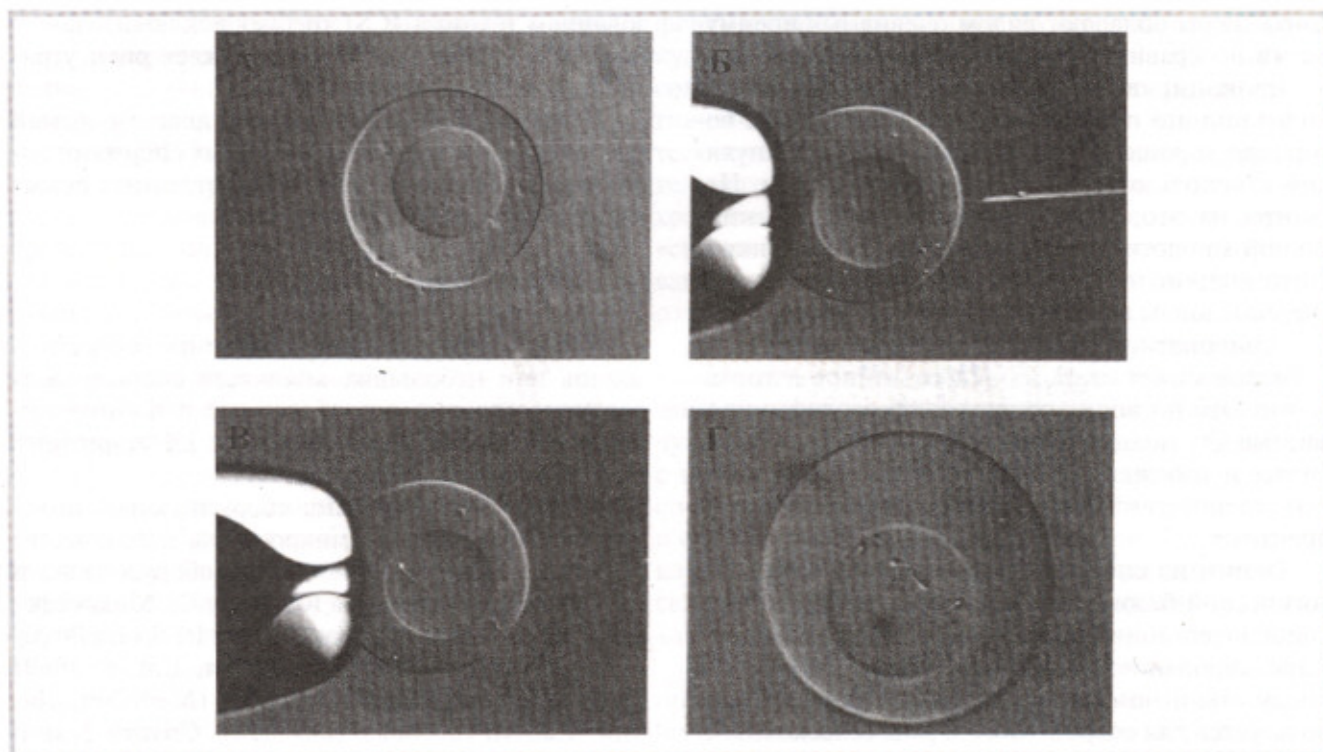


Рис. 2. Помещение сперматозоида в микроконтейнер из агарозы.

А – микросфера из агарозы диаметром ~100 мкм; Б – инъекция сперматозоида в полость микросферы; В – микросфера со сперматозоидом внутри; Г – микросфера с четырьмя сперматозоидами после размораживания.

ная вода, что исключает цитотоксический эффект, провокацию акросомной реакции и риск инфицирования. Подготовка к непосредственному использованию микросфер из агарозы, в отличие от ZP, не требует индивидуальной микрохирургической обработки, поэтому такие искусственные микроконтейнеры могут быть получены в необходимых количествах.

Для криоконсервации мы использовали сперматозоиды 11 пациентов с олигозооспермией (криптозооспермией), осложненной снижением подвижности (астенозооспермия) и нарушениями морфологии (тератозооспермия). Помещение сперматозоидов в микросферы и криоконсервацию проводили непосредственно после выполнения процедуры ICSI в программах ВРТ. Сохраненные с экспериментальной целью сперматозоиды в дальнейших репродуктивных процедурах не использовали.

Нами было заморожено 253 подвижных сперматозоида в 54 искусственно полученных микросферах из агарозы. После криоконсервации и последующего размораживания все сперматозоиды сохранили характерную нормальную морфологию, что указывает на отсутствие серьезных механических повреждений, связанных с образованием кристаллов льда. Из 253 спер-

матозоидов 162 (64%) восстановили подвижность. Суправитальное окрашивание эозином показало, что 78% (197 из 253) сперматозоидов сохранили целостность мембран, т.е. жизнеспособны. Снижение подвижности после размораживания может быть обусловлено изначально низкими морфокинетическими показателями спермы.

Криоконсервация в микроконтейнерах принципиально не отличается от криоконсервации с использованием стандартных протоколов, но при этом следует учитывать, что частота фертилизации, развития до стадии бластоцисты и наступления беременности также существенно снижена из-за качества генетического материала. Практическую применимость криоконсервации единичных сперматозоидов в микроконтейнерах подтверждает сообщение R. Walmsley и соавт. о рождении двух девочек-близнецов и беременностях после использования сперматозоидов, сохраненных в ZP [17]. К сожалению, это сообщение является, по-видимому, уникальным и не дает возможности судить о распространенности данной методики.

В большинстве случаев при выполнении ICSI выделение морфологически нормальных подвижных сперматозоидов требует значительных уси-



лий и времени, особенно при использовании материалов TESE и PESA. Кримоконсервация оставшихся уникальных сперматозоидов в микросферах избавляет эмбриолога от необходимости их

поиска и выделения в последующих попытках, а пациента от повторения травматичных операций и риска повторного неполучения генетического материала.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Palermo G., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A.C. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340:17—18.
2. Cohen J., Garrisi G.J., Congedo-Ferrara T.A. et al. Cryopreservation of single human spermatozoa. *Hum Reprod* 1997; 12: 994—1001.
3. Hsieh Y., Tsai H., Chang C., Lo H. Cryopreservation of human spermatozoa within human or mouse empty zona pellucidae. *Fertil Steril* 2000; 73: 694—698.
4. Hsieh Y.Y., Tsai H.D., Chang C.C., Lo H.Y. Sperm cryopreservation with empty human or mouse zona pellucidae. A comparison. *J Reprod Med* 2000; 45: 383—386.
5. Montag M., Rink K., Dieckmann U. et al. Laser-assisted cryopreservation of single human spermatozoa in cell-free zona pellucida. *Andrologia* 1999; 31: 49—53.
6. Levi-Setti P.E., Albani E., Negri L. et al. Cryopreservation of a small number of spermatozoa in yolk-filled human zonae pellucidae. *Arch Ital Urol Androl* 2003; 75: 195—198.
7. Borini A., Sereni E., Bonu, Flamigni C. Freezing a few testicular spermatozoa retrieved by TESA. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 169: 27—32.
8. Edirisinghe W.R., Junk S.M., Matson P.L., Yovich J.L. Changes in motility patterns during in-vitro culture of fresh and frozen/thawed testicular and epididymal spermatozoa: implications for planning treatment by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996; 11: 2474—2476.
9. Liu J., Garcia J.E., Baramki T.A. The difference in outcome of in-vitro culture of human testicular spermatozoa between obstructive and non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1996; 11: 1587—1588.
10. Liu J., Zheng X.Z., Baramki T.A. et al. Cryopreservation of a small number of fresh human testicular spermatozoa and testicular spermatozoa cultured in vitro for 3 days in an empty zona pellucida. *J Androl* 2000; 21: 409—413.
11. Just A., Gruber I., Wober M. et al. Novel method for the cryopreservation of testicular sperm and ejaculated spermatozoa from patients with severe oligospermia: a pilot study. *Fertil Steril* 2004; 82: 445—447.
12. Nebel R.L., Bame J.H., Saacke R.G., Lim F. Microencapsulation of bovine spermatozoa. *J Anim Sci* 1985; 60: 1631—1639.
13. Herrler A., Eisner S., Bach V. et al. Cryopreservation of spermatozoa in alginate acid capsules. *Fertil Steril* 2006; 85: 208—213.
14. Schuster T.G., Keller L.M., Dunn R.L. et al. Ultra-rapid freezing of very low numbers of sperm using cryoloops. *Hum Reprod* 2003; 18: 788—795.
15. Desai N.N., Blackmon H., Goldfarb J. Single sperm cryopreservation on cryoloops: an alternative to hamster zona for freezing individual spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2004; 9: 47—53.
16. Bouamama N., Briot P., Testart J. Comparison of two methods of cryoconservation of sperm when in very small numbers. *Gynecol Obstet Fertil* 2003; 31: 132—135 (Article in French).
17. Walmsley R., Cohen J., Ferrara-Congedo T. et al. The first births and ongoing pregnancies associated with sperm cryopreservation within evacuated egg zonae. *Hum Reprod* 1998; (Suppl 4): 61—70.

**Медицинский центр приглашает на работу эмбриолога.**

**Опыт работы обязателен**

**Тел.: (495) 165-2347**