

Влияние криоконсервированной фолликулярной жидкости человека на кинетическую активность спермиев

Е.А. ЯКОВЛЕВА, Г.Г. ЮРЧЕНКО, М.И. КРАМАР, А.Г. ГЕРОДЕС
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Cryopreserved Human Follicular Fluid on Spermatozoa Kinetic Activity

E.A. YAKOVLEVA, G.G. YURCHENKO, M.I. KRAMAR, A.G. GERODES
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

В работе показана возможность увеличения количества быстрых спермиев, получаемых методом всплывания ("swim up") из эякулята человека при нормоспермии и нарушениях сперматогенеза для вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), путем добавления в среду выделения активно-подвижных гамет 20%-й фолликулярной жидкости (ФЖ), криоконсервированной по одноэтапной программе. Установлено, что эффективность метода одинакова при использовании ФЖ, хранившейся в жидком азоте 1 и 6 мес. Это открывает возможность создания криобанка ФЖ для применения в репродуктологии при лечении бесплодия методами ВРТ.

Ключевые слова: фолликулярная жидкость, криоконсервирование, эякулят, спермии, метод всплывания, нормоспермия, астеноспермия, олигоастеноспермия, вспомогательные репродуктивные технологии.

У роботі показано можливість збільшення кількості швидких спермій, одержаних методом спливання ("swim up") з еякуляту людини при нормоспермії та порушеннях сперматогенезу для допоміжних репродуктивних технологій, шляхом добавлення в середовище спливання активно-рухомих гамет 20%-ї фолікулярної рідини (ФР), криоконсервованої за одноетапною програмою. Встановлено, що ефективність методу однакова при використанні ФР, що зберігалася в рідкому азоті 1 або 6 міс. Це відкриває можливість створення криобанку ФР для застосування в репродуктології при лікуванні безплідності методами ВРТ.

Ключові слова: фолікулярна рідина, криоконсервування, еякулят, спермії, метод спливання, нормоспермія, астеноспермія, олигоастеноспермія, допоміжні репродуктивні технології.

The research deals with the possibility of increasing the number of active rapidly moving spermatozoa, derived by swim-up method from human ejaculate at normospermia and spermatogenesis disorders for assisting reproductive technologies (ART) by adding 20% follicular fluid (FF) into swim-up medium for active rapidly moving gametes. FF was cryopreserved by one-stage program. It was established that the method efficiency was equal both when using FF been kept in liquid nitrogen during 1 and 6 months period. This provides the possibility to establish the FF cryobank for using in reproductology during infertility treatment by ART methods.

Key-words: follicular fluid, cryopreservation, ejaculate, spermatozoa, swim-up method, normospermia, asthenospermia, oligoasthenospermia, assisting reproductive technologies.

Эффективность ВРТ определяется прежде всего биологической полноценностью как женских, так и мужских гамет. Для лечения бесплодия, в том числе и в случаях, когда в браке оно связано с мужским фактором (концентрация спермиев в эякуляте – 10-15 млн и общий пул гамет менее 40 млн; отсутствие или незначительное содержание спермиев с быстрым поступательным движением, а также при наличии антиспермальных ауто-антител), применяется один из методов ВРТ – искусственная внутриматочная инсеминация спермой мужа.

При этом используются различные методы повышения биологической полноценности спермиев. В частности, методом всплывания (swim up) [2] выделяется подвижная фракция спермиев из эякулята мужа для последующего проведения внутриматочной инсеминации жене. Получив

ART efficiency is determined first of all by biological integrity of both female and male gametes. During infertility treatment, including the cases when in marriage it is associated with male (spermatozoa concentration in ejaculate of 10-15 mln and total gametes' pool is less than 40 mln; absence or low content of spermatozoa with fast forward movement, presence of antisperm autoantibodies as well), one of the ART methods is used, artificial intrauterine insemination by husband's sperm.

Various methods are used to increase the spermatozoa biological integrity. In particular, by swim-up method [2] motile spermatozoa fraction is isolated from husband's ejaculate for further intrauterine insemination to wife. During centrifugation of cellular ejaculate sediment, the nutrient medium is arranged on it in layers for the swimming up of motile gametes. To increase the isolation efficiency of motile spermatozoa fraction

Адрес для корреспонденции: Юрченко Г.Г., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-11-19, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Yurchenko G.G., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 772 1119, fax: +380 57 772 0084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

путем центрифугирования клеточный осадок эякулята, наслаивают на него питательную среду для всплывания подвижных гамет. Для повышения эффективности выделения подвижной фракции спермиев применяют различные фармакологические препараты: пентоксифиллин, кофеин, цитохром С и другие. Однако проблема получения достаточного количества быстрых спермиев для внутриматочной искусственной инсеминации спермой мужа остается актуальной.

Было предложено в среду всплывания спермиев добавлять 50% ФЖ человека, криоконсервированной с применением двухэтапного режима замораживания [1].

Учитывая, что ФЖ является дефицитным материалом, который можно получить только в программе экстракорпорального оплодотворения, целью данной работы было выяснить возможность снижения концентрации ФЖ в среде выделения подвижных спермиев из эякулята без снижения эффективности метода swim up и упрощения способа её криоконсервирования.

Материалы и методы

Материалом исследования служили эякуляты мужчин из бесплодных супружеских пар с нормо-, астено- и олигоастеноспермией.

Эякуляты получали путем мастурбации после 3-5 дней сексуального воздержания. При исследовании эякулятов руководствовались рекомендациями ВОЗ [3]. После полного разжижения в термостате при 37°C исследование проводили с помощью оптического микроскопа с увеличением в 200, 400, 1000. При определении концентрации и подвижности спермиев использовали счётную камеру Makler. Для выделения подвижной фракции спермиев из эякулята применяли метод всплывания в нашей модификации, позволяющей получить пул подвижных гамет, состоящий преимущественно из клеток с быстрой подвижностью.

Фолликулярную жидкость получали путём трансвагинальной пункции фолликулов яичников под контролем УЗИ в программе экстракорпорального оплодотворения и использовали после выделения из нее яйцеклеток и последующего однократного центрифугирования в течение 10 мин при 1500 об/мин. Все образцы использованной ФЖ соответствовали по биологическим характеристикам жидкости овуляторного периода организма пациенток.

Результаты и обсуждение

Работа состояла из 3-х серий экспериментов. В первой серии изучали возможность повысить эффективность выделения подвижных спермиев с

various pharmacological preparations: pentoxifylline, caffeine, cytochrome C, etc. are used. But the problem of receiving sufficient number of fast spermatozoa for artificial intrauterine insemination by husband's sperm has remained as actual.

The cryopreserved under two-stage freezing regimen human FF of 50% was proposed to be added into sperm swimming up medium [1].

Taking into account that FF is deficit material, which can be obtained only in IVF program, the aim of this work is to investigate the possibility to decrease FF concentration in the isolation medium of fast spermatozoa ejaculate without a decrease of swim-up method efficiency and its cryopreservation way simplification.

Materials and methods

Ejaculates of men from infertile couples with normoastheno- and oligoasthenospermia served as a research material.

Ejaculates were obtained by masturbation after 3-5 days of sexual abstention. The WHO recommendations were followed during the ejaculates examining [3]. After full rarefaction in thermostat at 37°C the investigation was performed by optical microscope with $\times 200, 400, 1000$ magnification. When determining the spermatozoa concentration and motility we used Makler counting chamber. For motile fraction isolation from ejaculate swim-up method in our modification was used, which allows to obtain motile gametes pool, mainly consisting of cells with fast motility.

Follicular fluid was received by transvaginal puncture of ovary follicles under ultrasound control in the IVF program and was used after isolation of ova from it with further single centrifugation for 10 minutes at 1500 rpm. All the samples of used FF corresponded to biological characteristics of ovulatory period fluid of patients' organism.

Results and discussion

The work consisted of 3 experimental series. In the first one there was studied the possibility to increase the fast spermatozoa isolation efficiency by means of FF adding into the swim-up medium under concentration lower than 50%. Ejaculates of 4-6 ml were used, each of them was divided into 4 sample groups, equal on volume.

During isolation of motile gametes fraction from the 1st group samples we did not add FF into the isolation medium, for the 2nd group samples we added 10% FF, for the 3rd group there were added 20% FF and to the 4th group we added 50% FF. The investigation results are presented in the Table 1.

Table 1 shows that, FF adding into isolation medium of motile gametes in all the cases significantly increased

Таблица 1. Эффективность выделения подвижной фракции спермиев из эякулята в среде, содержащей нативную ФЖ
Table 1. Efficiency of motile spermatozoa fraction isolation from ejaculate in the medium, containing native FF.

Состояние сперматогенеза пациентов Patients' spermatogenesis state	Характеристика эякулята Ejaculate characteristics			Содержание выделенной фракции гамет с быстрой поступательной подвижностью, % Content of gametes with fast forward motility in isolated fraction, %			
	концентрация спермиев, млн/мл spermatozoa concentration, mln/ml	суммарное содержание гамет "а" и "б", % total content of gametes 'a' and 'b', %	количество эякулятов number of ejaculates	Группы эякулятов Groups of ejaculates			
				1	2	3	4
Нормоспермия Normospermia	51,7 ± 5,8	53,8 ± 4,9	37	75,8 ± 3,5	84,5 ± 4,1 ¹	97,4 ± 6,2 ^{1, 2}	95,8 ± 5,6 ^{1, 2}
Астеноспермия Asthenospermia	32,6 ± 3,4	37,2 ± 3,3	41	66,1 ± 3,2	71,8 ± 5,3 ¹	85,2 ± 6,1 ^{1, 2}	84,9 ± 7,2 ^{1, 2}
Олигоастеноспермия Oligoasthenospermia	14,2 ± 1,3	29,3 ± 2,7	33	56,2 ± 3,8	66,1 ± 4,6 ¹	76,3 ± 7,2 ^{1, 2}	77,2 ± 6,1 ^{1, 2}

Примечания: ¹ – $p < 0,05$ при сравнении с показателями 1-й группы; ² – $p < 0,05$ при сравнении с показателями 2-й группы; гаметы "а" – с быстрой поступательной подвижностью, "б" – с медленной.

Notes: ¹ – $p < 0.05$ when comparing with data of 1st group; ² – $p < 0.05$ when comparing with data of 2nd group indices; "a" means gametes with fast forward motility, "b" means gametes with slow forward motility.

помощью добавления в среду всплывания ФЖ в концентрации менее 50%. Использовали эякуляты объемом 4-6 мл, каждый из которых разделяли на 4 равных по объему группы образцов.

При выделении подвижной фракции гамет из образцов 1-й группы в среду выделения ФЖ не добавляли, при работе с образцами 2-й группы добавляли 10%, 3-й группы – 20% и 4-й группы – 50% ФЖ. Результаты исследования приведены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, добавление ФЖ в среду выделения подвижных гамет во всех случаях достоверно повышало содержание быстрых спермиев в среде. При этом содержание подвижных спермиев в 3-й и 4-й группах было достоверно выше, чем в 1-й и 2-й.

При сравнении показателей 3-й и 4-й групп достоверных различий между ними выявлено не было ($p > 0,05$), т.е. эффективность метода выделения кинетически активных гамет при добавлении в среду выделения 20 или 50% нативной ФЖ одинакова. Поэтому в дальнейших исследованиях применяли ФЖ в конечной концентрации 20%.

Во второй серии экспериментов использовали ФЖ, хранившуюся в жидком азоте. В ранее предложенном методе [1] применяли двухэтапный режим замораживания с охлаждением на 1-м этапе со скоростью 3°C/мин, на 2-м – со скоростью 400°C/мин с последующим хранением в жидком азоте (-196°C). В данном исследовании применяли одноэтапный режим с использованием прямого погружения в жидкий азот (скорость 400°C/мин). С этой целью ФЖ делили на два образца. Первый образец замораживали по одноэтапному режиму,

motile spermatozoa content in the medium. In this case the content of motile spermatozoa in 3rd and 4th groups was statistically and significantly higher than in 1st and 2nd ones.

Comparing to the indices of 3rd and 4th groups no statistically significant differences between them ($p > 0.05$) revealed, that is the efficiency of the isolation method of kinetically active gametes when adding into isolation medium of 20 or 50% native FF is equal. Therefore in further investigations we used FF under final concentration of 20%.

In the second series of experiments there was used FF, cryopreserved in liquid nitrogen. In previously proposed method [1] there was used two-stage freezing regimen with cooling at the first stage with the rate of 3°C/min, with the rate of 400°C/min and further storage in liquid nitrogen (-196°C) at the second one. In this study we used one-stage regimen with direct immersion into liquid nitrogen (400°C/min rate). With this aim FF was divided into two samples. First sample was frozen according to one-stage regimen, the second sample was treated at two-stage one. It was thawed on water bath at 38°C. Ejaculates were also divided into two groups.

For isolation of first group gametes' motile fraction there was used the medium with 20% FF, frozen according to one-stage regimen, for the second group it was two-stage one.

Table 2 demonstrates that the efficiency of spermatozoa motile fraction isolation and ejaculate using the FF, frozen according to one-stage and two-stage regimens, was equal ($p > 0.05$ for all the cases).

In the third series of experiments the comparative investigation biological activity keeping for FF, frozen

второй – по двухэтапному. Отогревали на водяной бане при 38°C. Эякуляты также разделяли на две группы.

Для выделения подвижной фракции гамет из первой группы использовали среду с добавлением 20% ФЖ, замороженной по одноэтапному режиму, из второй – по двухэтапному.

Как видно из табл. 2, эффективность выделения подвижной фракции спермиев и эякулята при использовании ФЖ, замороженной по одно- и двухэтапному режиму, была одинаковой (во всех случаях $p > 0,05$).

В третьей серии экспериментов провели сравнительное изучение сохранности биологической активности ФЖ, замороженной по одноэтапному режиму в зависимости от срока хранения. Фолликулярную жидкость, полученную у пациенток, разделяли на два образца, которые замораживали по одноэтапному режиму. Один образец размораживали через 1 мес, второй – через 6 мес после пребывания в криобанке.

Таблица 3. Эффективность выделения подвижной фракции спермиев из эякулята в среде, содержащей криоконсервированную ФЖ разного срока хранения при -196°C

Table 3. Efficiency of motile spermatozoa fraction isolation from the ejaculate in the medium, containing cryopreserved FF of various storage terms at -196°C

Состояние сперматогенеза пациентов Patients' spermatogenesis state	Характеристика эякулята Ejaculate characteristics			Содержание выделенной фракции гамет с быстрой поступательной подвижностью, % Content of gametes with fast forward motility in isolated fraction, %	
	концентрация спермиев, млн/мл spermatozoa concentration, mln/ml	суммарное содержание гамет "а" и "б", % total content of gametes 'a' and 'b', %	количество эякулятов number of ejaculates	Группы эякулятов Groups of ejaculates	
				1	2
Нормоспермия Normospermia	42,1±3,9	56,2+5,1	25	91,2±7,9	87,3+8,2*
Астеноспермия Asthenospermia	24,3+2,5	35,1±3,6	21	80,2±7,1	77,8±6,9*
Олигоастено-спермия Olygoastheno-spermia	12,4±1,5	25,2±2,7	35	66,1±6,3	68,3±6,7*

Примечание: * – $p > 0,05$ при сравнении показателей 1-й и 2-й групп; гаметы "а" – с быстрой поступательной подвижностью, "б" – с медленной.

Notes: * – $p > 0.05$ when comparing the indices of 1st and 2nd group; "a" means gametes with fast forward motility, "b" means gametes with slow forward motility.

Таблица 2. Эффективность выделения подвижной фракции спермиев из эякулята в среде, содержащей криоконсервированную фолликулярную жидкость

Table 2. Efficiency of motile spermatozoa fraction isolation from the ejaculate in the medium, containing cryopreserved FF

Состояние сперматогенеза пациентов Patients' spermatogenesis state	Характеристика эякулята Ejaculate characteristics			Содержание выделенной фракции гамет с быстрой поступательной подвижностью, % Content of gametes with fast forward motility in isolated fraction, %	
	концентрация спермиев, млн/мл spermatozoa concentration, mln/ml	суммарное содержание гамет "а" и "б", % total content of gametes 'a' and 'b', %	количество эякулятов number of ejaculates	Группы эякулятов Groups of ejaculates	
				1	2
Нормоспермия Normospermia	45,8±4,2	54,7±5,3	19	94,8±7,2	92,1±8,7*
Астеноспермия Asthenospermia	28,5±2,7	33,6±3,9	25	81,6±8,3	79,3+7,7*
Олигоастено-спермия Olygoastheno-spermia	15,3±3,8	27,9±2,4	29	74,9+6,9	72,8±7,1*

Примечание: * – $p > 0,05$ при сравнении показателей 1-й и 2-й групп; гаметы "а" – с быстрой поступательной подвижностью, "б" – с медленной.

Notes: * – $p > 0.05$ when comparing the indices of 1st and 2nd group; "a" means gametes with fast forward motility, "b" means gametes with slow forward motility.

according to one-stage regimen, depending on the storage period was performed. Follicular fluid, derived from the patients was divided into two samples, which

were frozen according to one-stage regimen. One sample was thawed in a month, in 6 months of their storage in cryobank the second one.

Each ejaculate, under investigation was divided into two groups. During isolation of the first group spermatozoa motile fraction 20% of FF, stored into the liquid nitrogen during one month was added into the isolation medium and for the second group it was of 6 months' storage.

Table 3 shows, that there were no significant differences in the efficiency of FF, stored in liquid nitrogen for 1 and 6 months, both at normospermia, and at astheno- and oligoasthenospermia. In all the cases $p > 0.05$, that is the stimulation effect of kinetic activity of gametes with FF was similar.

Каждый исследуемый эякулят делили на две группы. При выделении подвижной фракции спермиев из первой группы в среду выделения добавляли 20% ФЖ, хранившейся в жидком азоте один месяц, второй – 6 мес.

Как видно из данных табл. 3, достоверных различий в эффективности применения ФЖ, хранившейся в жидком азоте 1 и 6 мес, не было как при нормоспермии, так и при астено- и олигоастеноспермии. Во всех случаях $p > 0,05$, т.е. эффект стимуляции кинетической активности гамет с помощью ФЖ был одинаков.

Выводы

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что добавление в среду выделения подвижной фракции спермиев из эякулятов с нормо-, астено- и олигоастеноспермией 20% ФЖ человека, криоконсервированной по одноэтапному методу замораживания, достоверно повышает эффективность метода всплывания.

При этом результативность метода одинакова при использовании ФЖ, хранившейся в жидком азоте как один, так и 6 мес.

Полученные данные представляют интерес для врачей-исследователей и гинекологов, занимающихся проблемами репродуктологии, а также для криобиологов, создающих криобанки биологически активных жидкостей организма человека.

Литература

1. Геродес А.Г., Юрченко Г.Г., Крамар М.И. Применение фолликулярной жидкости в методиках повышения фертильности спермы // Бесплодие: Вспомогательные репродуктивные технологии. Сб. науч. трудов симпозиума с международным участием.– Киев, 1997.– С. 154-157.
2. Lopata A., Patullo M.J., Chang A.A. A Method for collecting motile spermatozoa from human semen // Fertil. Steril.– 1976.– Vol. 27.– P. 667-684.
3. World Health Organization. Laboratory manual and sperm-cervical mucus interaction.– Cambridge: University Press, 2000.–128 p.

Поступила 12.10.2004

Conclusions

Adding of 20% human FF, cryopreserved according to one-stage freezing, into the isolation medium of spermatozoa motile fraction from ejaculates with normo-, astheno- and oligoasthenospermia, considerably increases the swim-up method efficiency.

In this case the method effectiveness is similar when using FF, stored in liquid nitrogen both during one and six months period.

Obtained data are of interest for research physicians and gynecologists, dealing with reproductology problems, and as well as for cryobiologists, establishing cryobanks of human biologically active fluids.

References

1. Gerodes A.G., Yurchenko G.G., Kramar M.I. Follicular fluid usage in sperm fertility increasing methodology // Infertility: Assisting reproductive technologies. Collection of scientific papers of symposium with international participation.– Kiev, 1997.– P. 154-157.
2. Lopata A., Patullo M.J., Chang A.A. A Method for collecting motile spermatozoa from human semen // Fertil. Steril.– 1976.– Vol. 27.– P. 667-684.
3. World Health Organization. Laboratory manual and sperm-cervical mucus interaction.– Cambridge: University Press, 2000.–128 p.

Accepted in 12.10.2004