

УДК 611.013.2:612.616.2:57.086.13

Петрушко М. П., Юрчук Т. А., Пиняев В. И., Гапон А. А., Павлович Е. В.

ТЕСТ НА ПЕНЕТРАЦИЮ С *Zona pellucida* КАК ПРЕДИКТОР ОПЛОДОТВОРЯЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ НАТИВНЫХ И КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ СПЕРМИЕВ ЧЕЛОВЕКА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

lenoni@mail.ru

Целью данной работы явилась оценка пенетрационной активности нативных и криоконсервированных спермиев при нормо- и олигоастенотератозооспермии. Рассчитывали частоту и индекс пенетрации, подсчитывая количество спермиев, связанных с пустой *ZP* ооцитов. Были обнаружены существенные различия в способности сперматозоидов при нормо- и патоспермии пенетрировать *ZP*. После криоконсервирования частота и индекс пенетрации не изменялись, в случае нормозооспермии, тогда как при олигоастенотератозооспермии значительно снижались.

Ключевые слова: криоконсервирование; витрификация; сперматозоиды; нормозооспермия; олигоастенотератозооспермия; пенетрация.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Данная работа является фрагментом НИР «Изучение влияния факторов криоконсервирования при витрификации на морфофункциональные характеристики репродуктивных клеток и эмбрионов», № гос. регистрации III-4,2.2.6.108.

Введение. Взаимодействие между сперматозоидами и *Zona pellucida* (*ZP*) является решающим этапом при оплодотворении.

Для проникновения в ооцит сперматозоиду необходимо достичь корона кумулюсный комплекс ооцита, пройти через гиалуроновую матрицу кумулюса и пенетрировать *ZP*, которая представляет собой гликопротеиновый слой, окружающий женскую гамету. Во время нахождения в женском половом тракте, сперматозоиды подвергаются серии биохимических и функциональных изменений, которые индуцируют экстремальный экзоцитоз. Оплодотворение происходит благодаря акросомальной реакции, при которой ферменты, высвобождаемые из головки спермия, смягчают *ZP* [4].

Количество сперматозоидов, их морфологические характеристики, подвижность и жизнеспособность не определяют их оплодотворяющую способность [2]. Тест на связывание с *ZP* имеет абсолютную прогностическую ценность, поскольку по-

зволяет оценить потенциал фертильности спермиев.

Целью данной работы явилось сравнение пенетрационной активности нативных и криоконсервированных спермиев при нормо- и олигоастенотератозооспермии.

Материалы и методы исследования. Все исследования выполнены с соблюдением правил биомедицинской этики. На проведение исследований было получено письменное, свободное и информированное согласие пациентов. Оценка эякулята проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ [8].

Контрольная группа 1 состояла из 10 образцов эякулятов с нормозооспермией. Группа 2 включала в себя образцы 22 мужчин с олигоастенотератозооспермией. Эякуляты были получены после 3–5 дней воздержания путем мастурбации.

Для выделения активноподвижной фракции эякулят наслаивали на градиент плотности Sperm Grade (COOK, США), центрифугировали при 600 г в течение 10 мин. Надосадок отбирали. К сперматозоидам добавляли 300 мкл культуральной среды Global total for fertilization (Global, США) и инкубировали в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂, 37°C и 95% влажности.

Криоконсервирование спермиев осуществляли путем витрификации. К суспензии спермиев в соотношении 1:1 добавляли криозащитную среду следующего состава: 15% глицерол (Sigma-Aldrich, США), 20% сывороточный альбумин человека (Life Global, США) в среде Sperm preparation medium («Cook», США). После 10 мин инкубации спермии помещали в микросоломинки: внешний диаметр 1 мм, длина 50 мм, объем 0,05 мл («COOK», США). После чего образцы моментально погружали в жидкий азот.

Для размораживания использовали водяную баню с температурой 42°C. Образцы отогревали 10 мин до полного исчезновения твердой фазы. Отмывку от криопротектора осуществляли в среде Sperm preparation medium («Cook», США) и проводили оценку жизнеспособности спермиев путем подсчета подвижных форм.

Неоплодотворенные ооциты человека помещали в 0,1% раствор гиалуронидазы и диспергировали в течение 5–10 мин для удаления кумулюсных клеток. Затем ооциты трижды промывали в культуральной среде. С помощью микроманипулятора (Narishiga, Япония) и микроиглол (COOK, США) проводили удаление цитоплазмы из ZP.

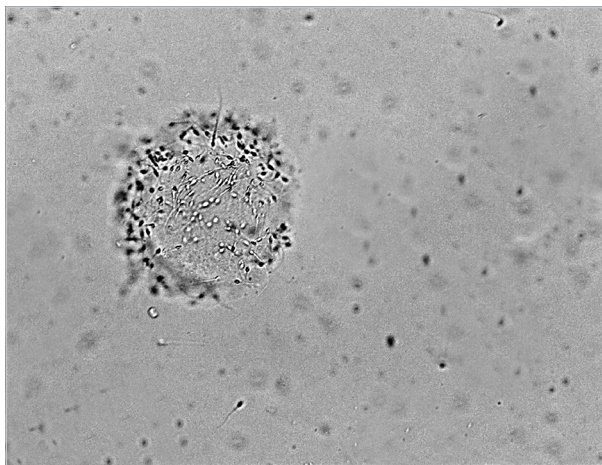
Инкубацию сперматозоидов с ZP проводили в 50 мкл культуральной среды, покрытых минеральным маслом в четырехлуночных планшетах (Nunc, Дания) на протяжении 2 ч. Анализ образцов проводили с помощью инвертированного микроскопа Olympus IX-71 («Olympus», Япония).

Рассчитывали частоту пенетрации – отношение количества ооцитов со сперматозоидами в ZP ко всем ооцитам $\times 100\%$ и индекс пенетрации – отношение количества связанных сперматозоидов пациента к количеству связанных сперматозоидов донора.

Результаты исследования и их обсуждение.

Среднее количество спермиев в группе 1 в нативном эякуляте составило $46,7 \pm 8,8$, в группе 2 – $12,4 \pm 3,6$ млн/мл ($p < 0,01$). Фракция активноподвижных спермиев – $27,9 \pm 3,5$ и $8,2 \pm 1,1\%$ ($p < 0,001$), для группы 1 и 2 соответственно.

Мы обнаружили существенные различия в способности сперматозоидов группы 1 и 2 пенетрировать ZP (рис.).



Пенетрация спермиями Zona pellucida. Нативный препарат. Световая микроскопия, $\times 400$.

Частота пенетрации спермиев при нормозооспермии составила $86,6 \pm 8,5\%$, при олигоастенотератозооспермии – $17,9 \pm 4,5\%$ ($p < 0,001$).

После криоконсервирования частота пенетрации спермиев при нормозооспермии не изменилась и составила $84,4 \pm 9,2\%$ ($p < 0,05$), однако при олигоастенотератозооспермии достоверно снизилась до $9,9 \pm 3,3\%$ ($p < 0,001$).

Индекс пенетрации составил $0,85 \pm 0,19$ и $0,17 \pm 0,07\%$ для 1 и 2 группы, соответственно ($p < 0,01$).

После криоконсервирования индекс пенетрации для спермиев из нормозооспермических эякулятов остался на прежнем уровне, тогда, как при олигоастенотератозооспермии снизился до $0,03 \pm 0,06\%$ ($p < 0,01$) (табл.).

Частота и индекс пенетрации *Zona pellucida* спермиями при нормо- и олигоастенотератозооспермии до и после криоконсервирования, ($M \pm m$)

Группа наблюдения	Частота пенетрации (%)	Индекс пенетрации (абс.)
Натив, нормозооспермия	$86,6 \pm 8,5$	$0,85 \pm 0,19$
Криоконсервирование, нормозооспермия	$84,4 \pm 9,2$	$0,84 \pm 0,18$
Натив, олигоастенотератозооспермия	$17,9 \pm 4,5^*$	$0,17 \pm 0,07^*$
Криоконсервирование, олигоастенотератозооспермия	$9,9 \pm 3,3^{**}$	$0,03 \pm 0,06^{**}$

Примечания: * – отличия статистически значимы в сравнении с соответствующим показателем нативного эякулята при нормозооспермии, ($p < 0,001$);

** – отличия статистически значимы в сравнении с соответствующим показателем нативного эякулята при нормо- и олигоастенотератозооспермии ($p < 0,01$).

При олигоастенотератозооспермии и тяжелой тератозооспермии наблюдается высокая ($>70\%$) частота дефектного взаимодействия сперматозоидов и ZP [5].

Показано, что существует корреляция между количеством спермиев, которые связываются с ZP с их оплодотворяющей способностью и качеством полученных эмбрионов [6]. Существуют лишь единичные публикации об успешном оплодотворении ооцитов, лишенных ZP, методом ICSI [1].

Взаимодействие спермия с ZP, является ключевой ступенью в оплодотворении ооцитов человека. Известно, что ZP содержит три гликопротеина: ZP1, ZP2 и ZP3. Оплодотворение сопровождается слиянием периферических кортикальных гранул с мембраной, приводя к выходу содержимого кортикальных гранул в периветеллиновое пространство. Этот экзоцитоз модифицирует матрикс ZP, предупреждая полиспермию [7].

Данные результаты необходимо учитывать при выборе тактики оплодотворения при использовании криоконсервированных спермиев, особенно в случае олигоастенотератозооспермии, что подтверждается недавно опубликованными исследованиями [3].

Тест на пенетрацию с *Zona pellucida* может быть использован как предиктор оплодотворяющей способности нативных и криоконсервированных спермиев человека.

Выводы. Частота и индекс пенетрации ZP спермиями из нормозооспермических эякулятов значимо выше, чем при олигоастенотератозооспермии. Факторы криоконсервирования не влияют на способность спермиев связываться с ZP при нормозооспермии, однако значимо приводят к их снижению при олигоастенотератозооспермии. Поскольку первым этапом оплодотворения является связывание спермия с ZP, то полученные нами данные могут быть использованы как предиктор оплодотворяющей способности нативных и криоконсервированных спермиев человека.

Перспективы дальнейших исследований. Пенетрационная активность спермиев является предиктором их оплодотворяющей способности при проведении программы экстракорпорального оплодотворения в лечении бесплодия. Перспективным является выяснение корреляции между частотой и индексом пенетрации и оплодотворяющей способности спермиев, чему будут посвящены дальнейшие исследования.

Литература

1. Петрушко М. П. Беременность после переноса эмбриона, полученного при оплодотворении ооцита, лишённого *Zona pellucida*, криоконсервированным эпидидимальным спермием (описание случая) / М. П. Петрушко, В. И. Пиняев, В. В. Подуфалий [и др.] // Проблемы репродукции. – 2013. – № 2. – С. 62–64.
2. Guzick D. S. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men / D. S. Guzick, J. W. Overstreet, P. Factor-Litvak [et al.] // N. Eng. J. Med. – 2001. – Vol. 345. – P. 1388–1393.
3. Jin R. Outcomes of intracytoplasmic sperm injection using the zona pellucida-bound sperm or manually selected sperm / R. Jin, J. Bao, D. Tang [et al.] // J. Assist. Reprod. Genet. – 2016. – Vol. 33 (5). – P. 597–601.
4. Kozlovsky P. Sperm penetration to the zona pellucida of an oocyte: a computational model incorporating acrosome reaction / P. Kozlovsky, A. Gefen // Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin. – 2016. – Vol. 16(10). – P. 1106–1111.
5. Liu DY. Assessment of human sperm function and clinical management of male infertility / D. Y. Liu, H. W. Baker // Zhonghua Nan Ke Xue. – 2007. – Vol. 13 (2). – P. 99–109.
6. Liu N. Sperm-oocyte interaction and in vitro fertilization clinical outcomes in patients with unexplained infertility / N. Liu, Z. Zhang, Y. Li // Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. – 2011. – Vol. 36 (5). – P. 439–447.
7. Spargo S. C. Evolution and nomenclature of the zona pellucida gene family / S. C. Spargo, R. M. Hope // Biol. Reprod. – 2003. – Vol. 68. – P. 358–362.
8. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. – Switzerland: WHO, 2010. – 271 p.

References

1. Petrushko MP, Pinyayev VI, Podufaliy VV, Pravdina SS, Chub NN. Beremennost' posle perenosa embriona, poluchennogo pri oplodotvorenii ootsita, lishennogo Zona pellucida, riokonservirovannym epididimal'nym spermijem (opisaniye sluchaya). Problemy reproduksii. 2013;2:62–4.
2. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. N Eng J Med. 2001;345:1388–93.
3. Jin R, Bao J, Tang D, et al. Outcomes of intracytoplasmic sperm injection using the zona pellucida-bound sperm or manually selected sperm. J Assist Reprod Genet. 2016;33(5):597–601.
4. Kozlovsky P, Gefen A. Sperm penetration to the zona pellucida of an oocyte: a computational model incorporating acrosome reaction. Comput Methods Biomech Biomed Engin. 2016;16(10):1106–11.
5. Liu DY, Baker HW. Assessment of human sperm function and clinical management of male infertility. Zhonghua Nan Ke Xue. 2007;13(2):99–109.
6. Liu N, Zhang Z, Li Y. Sperm-oocyte interaction and in vitro fertilization clinical outcomes in patients with unexplained infertility. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2011;36(5):439–47.
7. Spargo SC, Hope RM. Evolution and nomenclature of the zona pellucida gene family. Biol Reprod. 2003;68:358–62.
8. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Switzerland, WHO; 2010. 271 p.

УДК 611.013.2:612.616.2:57.086.13

ТЕСТ НА ПЕНЕТРАЦІЮ З *Zona pellucida* ЯК ПРЕДИКТОР ЗАПЛІДНЮЮЧОЇ ЗДАТНОСТІ НАТИВНИХ І КРІОКОНСЕРВОВАНИХ СПЕРМІЇВ ЛЮДИНИ

Петрушко М. П., Юрчук Т. А., Пиняєв В. І., Гапон А. А., Павлович Є. В.

Резюме. Метою даної роботи була оцінка пенетраційної активності нативних та криоконсервованих спермій при нормо- і олигоастенотератозооспермії. Розраховували частоту та індекс пенетрації, підрахо-

вуючи кількість сперміїв, що зв'язалися з порожньою ZP ооцитів. Були виявлені суттєві відмінності в здатності сперматозоїдів при нормо- і патоспермії пенетрувати ZP. Після кріоконсервування частота та індекс пенетрації не змінювались, в разі нормозооспермії, тоді як при олігоастенотератозооспермії значимо знижувались.

Ключові слова: кріоконсервування; вітрифікація; сперматозоїди; нормозооспермія; олігоастенотератозооспермія; пенетрація.

UDC 611.013.2:612.616.2:57.086.13

THE PENETRATION TEST WITH *Zona pellucida* AS A PREDICTOR OF THE FERTILIZING CAPACITY OF NATIVE AND CRYOPRESERVED HUMAN SPERMATOZOA

Petrushko M. P., Yurchuk T. A., Pinaev V. I., Gapon A. A., Pavlovich E. V.

Abstract. In order to fertilize oocyte the sperm need to penetrate into *Zona pellucida* surrounding the female gamete and consisting of glycoprotein. The purpose of this work was to evaluate the penetration activity of native and cryopreserved sperm with normo- and oligoasthenoteratozoospermia.

Control group 1 consisted of 10 samples of ejaculates with normozoospermia. Group 2 included the samples of 22 men with oligoasthenoteratozoospermia. Cryopreservation of spermatozoa was carried out by vitrification.

The penetration rate and index were calculated by counting the number of spermatozoa associated with empty ZP oocytes.

The average number of spermatozoa in group 1 was 46.7 ± 8.8 , in group 2 it made 12.4 ± 3.6 million/ml ($p < 0.01$). The fractions of progressive motile spermatozoa were 27.9 ± 3.5 and $8.2 \pm 1.1\%$ ($p < 0.001$), for group 1 and 2, respectively. We found significant differences in the ability of spermatozoa from group 1 and 2 to penetrate ZP. The penetration rate of spermatozoa with normozoospermia was $86.6 \pm 8.5\%$, with oligoasthenoteratozoospermia it made $17.9 \pm 4.5\%$ ($p < 0.001$).

After cryopreservation, the penetration rate of spermatozoa with normozoospermia did not change and made $84.4 \pm 9.2\%$ ($p < 0.05$), however, with oligoasthenoteratozoospermia was significantly decreased down to $9.9 \pm 3.3\%$ ($p < 0.001$).

The penetration index was 0.85 ± 0.19 and $0.17 \pm 0.07\%$ for groups 1 and 2, respectively ($p < 0.01$).

After cryopreservation, the penetration index for spermatozoa from normozoospermic ejaculates remained at the same level, whereas in oligoasthenoteratozoospermia was decreased up to $0.03 \pm 0.06\%$ ($p < 0.01$).

ZP penetration rate and index of spermatozoa from normozoospermic ejaculates is significantly higher than with oligoasthenoteratozoospermia. Cryopreservation factors do not affect to spermatozoa ability to bind with ZP in normozoospermic group and significantly reduce this index at oligoasthenoteratozoospermic group.

The penetration test with *Zona pellucida* can be used as a predictor of fertilizing ability of native and cryopreserved human spermatozoa.

These results should be considered when choosing the tactics of fertilization with cryopreserved spermatozoa, especially in the case of oligoasthenoteratozoospermic semen samples.

Promising is the elucidation of the correlation between the frequency and the index of penetration and fertilizing capacity of spermatozoa, that will be the subject of further studies.

Keywords: cryopreservation; vitrification; spermatozoa; normozoospermia; oligoasthenoteratozoospermia; penetration.

Стаття надійшла 10.03.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування