

## ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ХРАНЕНИЯ И УСЛОВИЙ КРИОКОНСЕРВАЦИИ НА СТЕПЕНЬ ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2016 г. Е.Ю. Симоненко, С.Б. Гармаева, С.А. Яковенко, А.А. Григорьева, В.А. Твердислов, А.Г. Миронова\*, В.П. Апрышко\*

Физический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/2;

\*Клиника «АльтраВита», 117186, Москва, ул. Нагорная, 4а

E-mail: ksimonenko@inbox.ru, sb.garmaeva@physics.msu.ru

Поступила в редакцию 08.12.15 г.

Методом прямого мечения разрывов ДНК исследовано влияние различных температурных режимов хранения сперматозоидов человека, в том числе криоконсервации, на структуру организации ДНК в них. На 19 образцах спермы доноров и пациентов с установленной нормозооспермией (по критериям Всемирной организации здравоохранения) показано значительное увеличение фрагментации ДНК сперматозоидов через 8 ч инкубации при 39°C (на 76,7%) и при 37°C (на 68,9%). Установлено, что криоконсервация с применением криопротекторов непосредственно после разморозки не дает значимых отличий в степени фрагментации ДНК, однако через 24 ч инкубации обнаружено резкое увеличение степени фрагментации ДНК в образцах, содержащих криопротектор, что может свидетельствовать о его цитотоксичности.

*Ключевые слова:* фрагментация ДНК, сперматозоид, вспомогательные репродуктивные технологии, криоконсервация, температура инкубации.

Целостность генетического материала обоих родителей необходима для полноценного развития эмбриона. Мужской фактор в проблемах наступления биохимической, клинической беременности, а также развития эмбриона является самостоятельным в половине случаев. Известно, что доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК у фертильных и инфертильных мужчин значительно отличается [1]. Влияние степени фрагментации ДНК на оплодотворение подтверждают следующие данные:

– вероятность оплодотворения *in vivo* близка к нулю при уровне фрагментации ДНК свыше 30% (метод sperm chromatin structure assay) [2];

– для достижения успешной беременности в циклах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и интродитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ) необходимо значение индекса фрагментации ДНК < 20%.

Сокращения: ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение, ИКСИ – интродитоплазматическая инъекция сперматозоида, ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии, TUNEL – метод прямого мечения разрывов ДНК (terminal deoxynucleotidyl transferases dUTP nick end labeling).

На данном этапе развития вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) для однозначной постановки диагноза мужской фертильности необходима информация о целостности ДНК, независимо от показателей рутинных тестов спермы (измерение объема спермы, pH, концентрации, подвижности и жизнеспособности сперматозоидов, морфологический анализ), так как методы световой микроскопии не выявляют дефектов ДНК сперматозоида, а также в силу изменчивости и противоречивой статистики этих тестов [1]. Сперматозоиды даже со значительным уровнем повреждений ДНК сохраняют способность оплодотворить ооцит [3].

Физиологические причины возможных нарушений структуры ДНК сперматозоида в виде одно- и двучепочечных разрывов кроются в особенностях упаковки ДНК в половых клетках, так как в отличие от соматических клеток упаковка первичной нити ДНК производится нуклеопротеиновым комплексом.

У большинства млекопитающих результатом сперматогенеза являются высоко однородные (гомогенные) сперматозоиды. Например, ядро сперматозоида мыши содержит более 95% протаминов в качестве белкового компонента

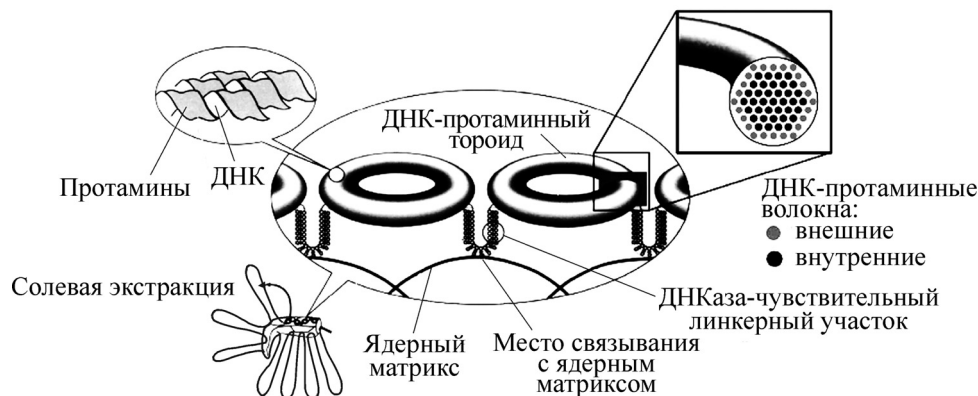


Рис. 1. Тороидная модель строения хроматина (согласно работе [4]).

их нуклеопропротеидов. Это позволяет ядру зрелого сперматозоида иметь объем в 40 раз меньше объема ядра соматической клетки. Ядро сперматозоида человека, однако, содержит значительно меньше протаминов (около 85%), чем ядра сперматозоидов быка, лошади, хомяка и мыши. Хроматин сперматозоида человека, таким образом, менее регулярно уплотнен и часто содержит разрывы ДНК [1].

В начале 1990 годов в работе W.S. Ward [4] была предложена модель структурной организации ДНК в ядре сперматозоида. Согласно данной модели, структурными единицами нуклеопротаминового хроматина являются тороиды – кольцевые структуры толщиной около 20 нм, с внешним диаметром около 90 нм и внутренним диаметром около 15 нм. Отдельные тороиды представляют собой высококонденсированные протаминами петлевые домены ДНК, которые прикреплены своим основанием к ядерному матриксу (рис. 1); тороиды «сшиты» дисульфидными связями, образованными в результате окисления сульфгидрильных групп цистеина, присутствующего в протаминах. Таким образом, каждая хромосома представляет собой гирлянду из тороидодов. Центромеры всех 23 хромосом сосредоточены в центре ядра и образуют компактный хромоцентр; теломеры расположены на периферии ядра, где они взаимодействуют друг с другом, образуя димеры [4]. Данная концепция является общепринятой на сегодняшний день, хотя существуют и другие гипотезы упаковки нуклеопротаминовых комплексов. Изменчивость строения хроматина в гаметах человека, по сравнению с другими млекопитающими, связана с сохранением 15% гистонов и содержанием не одного типа протаминов (P1), а двух (добавляется P2) [1].

Основными источниками фрагментации ДНК считаются: недостатки рекомбинации генетического материала в процессе сперматогенеза; аномальное созревание сперматиды (нарушение протаминации); апоптоз тестикулярных зародышевых клеток; окислительный стресс.

Биологическое влияние аномальной структуры хроматина зависит в совокупности от повреждений и способности ооцита эти повреждения восстановить. В том случае, если ооциту не удастся репарировать повреждения до начала первого деления, эмбриональное развитие может блокироваться на разных этапах [3]. Проблема целостности генома мужских гамет актуальна для диагностики и лечения мужского бесплодия, повышения эффективности методов вспомогательных репродуктивных технологий и предотвращения передачи генетических дефектов при использовании ВРТ, особенно при инъекции сперматозоида в яйцеклетку (метод ИКСИ), способной преодолеть естественный барьер высокой степени фрагментации ДНК и дать начало успешной беременности с отрицательными последствиями [5]. Отцовский эффект может быть связан с такими генетическими факторами, как генные мутации, микроделеции, анеуплоидии, эпигенетические нарушения, повреждения ДНК и нарушения компактизации хроматина [6].

Физические факторы, связанные с методами ВРТ, такие как температура инкубации эякулята и условия его хранения, могут являться причинами фрагментации ДНК [7]. Было отмечено, что длительная инкубация сперматозоидов *in vitro* при различных условиях приводит к потере подвижности и жизнеспособности. Эти изменения могут быть следствием метаболических изменений, вызванных условиями культивирования [8]. Часто в лабораториях сперматозоиды инкубируют при физиологической температуре (37°C) в течение одного–двух часов перед процедурами ЭКО и ИКСИ. Данные, полученные в некоторых исследованиях, свидетельствуют о том, что температура инкубации

значительно влияет на уровень фрагментации ДНК сперматозоида [9]. Ранее методом прямого мечения разрывов ДНК (TUNEL – terminal deoxynucleotidyl transferases dUTP nick end labeling) было показано, что через 2 ч инкубации при 37°C происходит снижение морфологической целостности ядра сперматозоида по сравнению с исходным состоянием в 1,5 раза, также возрастает количество ядер, содержащих вакуоли.

В методах ВРТ используется низкотемпературное хранение образцов спермы (криоконсервация). Для пациентов с приобретенным бесплодием криоконсервация является единственным способом получить потомство после перенесенных заболеваний. Известно, что в процессе криоконсервации сперматозоиды вследствие различных причин (холодовой шок, осмотический шок, механические воздействия на мембраны) повреждаются, что влияет на их подвижность и морфологические показатели. При этом подвижность и оплодотворяющая способность сперматозоидов после криоконсервации уменьшается в широких пределах, в среднем на 30–70%. Важно понимать, влияет ли процесс заморозки на целостность ДНК сперматозоидов.

Мы видим, что температурный режим может оказывать непосредственное влияние на исход процедур ЭКО и ИКСИ. При высокой фрагментации ДНК сперматозоидов особенно велик риск отбора сперматозоида со скрытым дефектом ДНК, который может негативно отразиться на исходе беременности. В данной работе методом TUNEL исследуется влияние различных температурных режимов на структуру организации ДНК в сперматозоидах.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась на образцах спермы 19 доноров и пациентов с установленной нормозоспермией (по критериям Всемирной организации здравоохранения). Для оценки параметров сперматозоидов применяли рутинные методы, используемые в клинике «АльтраВита» – оценку концентрации и подвижности с помощью камеры Маклера; оценку морфологических характеристик с помощью предварительно окрашенных (метиленовый синий и кризоловый фиолетовый) стекол по критериям Крюгера (количество сперматозоидов 60–150 млн/мл, из них подвижных (тип а+б) – не менее 70%, сперматозоидов с нормальной морфологией не менее 13%). Для оценки целостности ядерной ДНК в работе использовали метод TUNEL. В качестве основного флуорохрома применяли флуоресце-

ин-12-dUTP, флуоресцентное контрокрашивающее выполняли с использованием красителя Hoechst 33258. Подсчет проводили на 500 сперматозоидах (микроскоп Olympus BX51).

Криоконсервацию образцов осуществляли по стандартному протоколу медленной заморозки с использованием криопротектора SpermFreeze (SAGE In-Vitro Fertilization Inc., Trumbull, США) в соотношении 1:0,5; быстрая разморозка при 37°C.

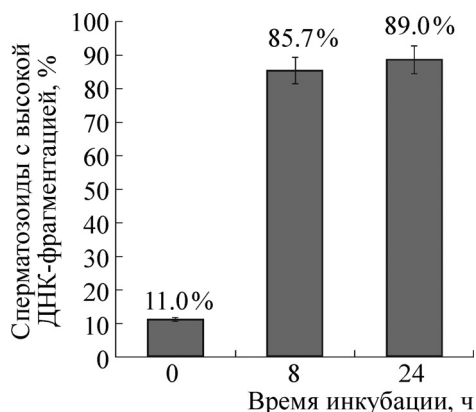
При статистической обработке данных приведены средние значения и стандартные отклонения для всех серий экспериментов; уровень статистической значимости различий был определен как  $P \leq 0,05$ .

**Модифицированный протокол работы TUNEL** включал следующие процедуры: приготовление и высушивание мазков на стекле в течение 30 мин; фиксацию клеток (3,7% параформальдегид на фосфатно-солевом буфере) 20 мин при +4°C; отмывку от фиксатора двумя сменами фосфатно-солевого буфера по 5 мин; пермеабиллизацию в 0,2% тритона X-100 на фосфатно-солевом буфере 5 мин; тщательную отмывку в трех сменах фосфатно-солевого буфера по 5 мин; реакцию мечения разрывов ДНК в течение одного часа при 37°C. Для ингибирования реакции мечения клетки инкубировали в 2xSSC-буфере 20 мин. После трехкратной отмывки в фосфатно-солевом буфере по 5 мин препараты окрашивали красителем Hoechst и заключали в глицерин по стандартной методике.

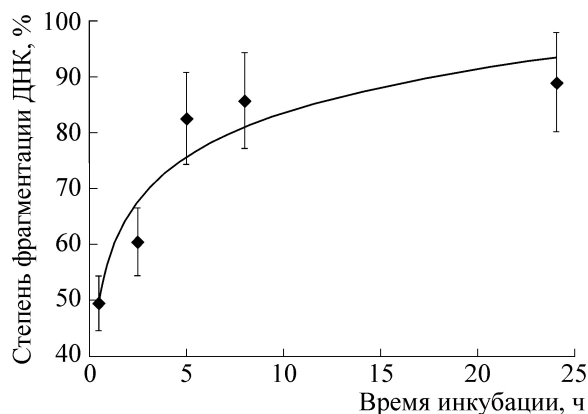
Был проведен негативный контроль: окрашивание по протоколу без добавления терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы, таким образом посчитана ошибка метода (3–5%).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения влияния температурных режимов хранения на степень фрагментации ДНК сперматозоидов была проведена серия экспериментов при температурах 21 и 39°C через интервалы времени 0/8/24 ч. Для температуры 37°C, используемой в некоторых лабораториях, временной интервал составлял 0/0,5/2,5/5/8/24 ч. Нами было обнаружено значительное увеличение с течением времени количества сперматозоидов с фрагментированной ДНК для всех выбранных температур. Самое большое изменение наблюдалось для температуры 39°C – через 24 ч инкубации фрагментация ДНК составила около 90%, причем уже через 8 ч доля фрагментированной ДНК увеличилась на  $76,7 \pm 7,9\%$  (рис. 2).



**Рис. 2.** График зависимости доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК от времени для температуры 39°C.

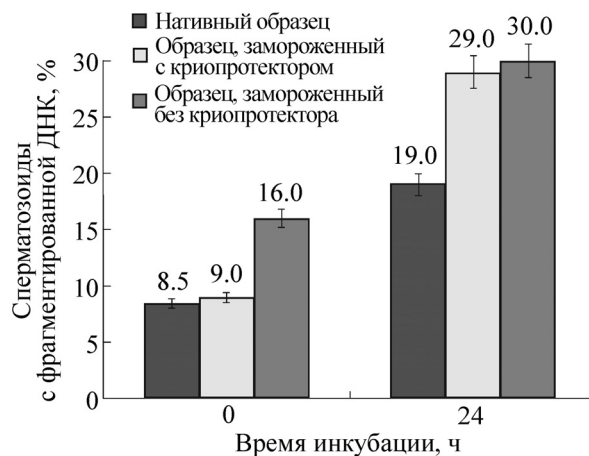


**Рис. 3.** Кинетика изменения количества сперматозоидов с фрагментированной ДНК во время инкубации при температуре 37°C.

Инкубация при 21°C в течение 24 ч увеличила долю фрагментированной ДНК только в  $2,2 \pm 0,29$  раза.

Эксперименты при 37°C показали, что основное количество фрагментированной ДНК в сперматозоидах возникает в первые восемь часов инкубации (зависимость доли фрагментированной ДНК от времени при 37°C имеет нелинейный характер). Вероятно, процесс, приводящий к фрагментации ДНК, инициируется в первые часы инкубации (рис. 3). Нелинейный вид кривой энергии активации позволяет предположить некоторую пороговую температуру, начиная с которой в системе начинают действовать другие процессы, например капацитация. Это подтверждается тем фактом, что при инкубации спермы при комнатной температуре капацитация не наступает, блокирующий эффект преодолевается, когда сперматозоиды подвергаются воздействию температуре 37°C. Можно сделать предположение, что большинство сперматозоидов обладает нерепарированными разрывами ДНК, возникшими в ходе сперматогенеза и как результат неоконченного апоптоза, что делает их более подверженными воздействию окислительного стресса.

Была использована следующая схема эксперимента для исследования влияния криоконсервации на степень фрагментации ДНК: эякулят делился на три части – для заморозки без криопротектора, с криопротектором и нативный образец. Фрагментацию ДНК регистрировали при заборе образца, непосредственно после заморозки/разморозки и через 24 ч после разморозки. В образцах, замороженных без добавления криопротектанта, доля фрагментированной ДНК увеличилась в  $1,9 \pm 0,4$  раз, в то время как образцы с добавлением криопротек-



**Рис. 4.** Влияние условий криоконсервации на степень фрагментации ДНК сперматозоидов непосредственно после заморозки и через 24 ч.

танта практически не отличались от нативных образцов (в пределах ошибки). Такое увеличение фрагментированной ДНК является фатальным для мужчин, обладающих фрагментацией в нативном образце свыше 7%, так как снижается результативность процедуры ЭКО и увеличивается риск отбора сперматозоида с поврежденным генетическим материалом, что может привести к неправильному развитию эмбриона и его потере. После инкубации в течение 24 ч при 21°C количество сперматозоидов с фрагментированной ДНК в нативных образцах и образцах, замороженных без добавления криопротектора, увеличилось в среднем в два раза (рис. 4). В образцах, замороженных с добавлением криопротектора, доля фрагментированной ДНК возросла более чем в три раза ( $3,1 \pm 0,32$  раза).

Необходимо отметить, что во время инкубации в течение 24 ч после криоконсервации

все образцы были отмыты от криопротектора и находились в равных условиях. Криопротектор SpermFreeze является проникающим. По данным эксперимента можно сделать вывод о цитотоксичности криопротекторов и его влиянии на степень фрагментации ДНК в клетках. Существует гипотеза, что отклонения в процессе сперматогенеза могут привести к изменениям в упаковке хроматина и недостаткам в протаминации, что делает ДНК сперматозоида более чувствительной и уязвимой по отношению к различного рода воздействиям. Одним из механизмов происхождения повреждений ДНК сперматозоида принято считать существование каскада изменений, который начинается с возникновения окислительного стресса и формирования аддуктов окисленных оснований ДНК, что впоследствии приводит к фрагментации ДНК и гибели клетки [10].

### ВЫВОДЫ

Таким образом, температурный режим может оказывать непосредственное влияние на исход процедур ЭКО и ИКСИ. В работе показано значительное увеличение доли фрагментированной ДНК сперматозоидов с течением времени для всех значений температур. Однако при 37 и 39°C доля фрагментированной ДНК выше, чем при 21°C. При криоконсервации с применением криопротекторов непосредственно после разморозки нет значимых отличий в степени повреждения ДНК, однако через 24 ч инкубации в образцах, содержащих криопротектор,

обнаружено резкое увеличение доли фрагментированной ДНК.

Данная статья подготовлена по материалам V Съезда биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015).

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-0029).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Erenpreiss, M. Spano, J. Erenpreisa, et al., *Asian J. Androl.* **8** (1), 11 (2006).
2. D. P. Evenson, L. K. Jost, D. Marshall, et al., *Hum. Reprod.* **14**, 1039 (1999).
3. D. Sakkas and J. G. Alvarez, *Fertil. Steril.* **93** (4), 1027 (2010).
4. W. S. Ward and D. S. Coffey, *Biol. Reprod.* **44** (4), 569 (1991).
5. R. J. Aitken and C. Krausz, *Reproduction* **122**, 497 (2001).
6. Е. В. Маркова и А. С. Замай, *Пробл. репрод.* **4**, 42 (2006).
7. K. L. Larson, C. J. DeJonge, A. M. Barnes, et al., *Hum. Reprod.* **15**, 1717 (2000).
8. P. N. Schlegel and D. A. Paduch, *Fertil. Steril.* **84** (4), 854 (2005).
9. L. H. Dalzell, C. M. McVicar, N. McClure, et al., *Fertil. Steril.* **82**, 1443 (2004).
10. R. J. Aitken and L. Bennetts, in: *The Sperm Cell Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*, Ed. by Ch. J. De Jonge and Ch. L. R. Barratt (Cambridge University Press, 2006), pp. 170–194.

## Influence of Storage Temperature and Cryopreservation Conditions on the Extent of Human Sperm DNA Fragmentation

**E.Yu. Simonenko\*, S.B. Garmaeva\*, S.A. Yakovenko\*, A.A. Grigorieva\*, V.A. Tverdislov\*, A.G. Mironova\*\*, and V.P. Aprishko\*\***

\*Physics Department, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia

\*\*Clinic "AltraVita", ul. Nagornaya 4a, Moscow, 117186 Russia

With the direct labeling procedure for detecting DNA fragmentation we explored the influence of the different storage temperature conditions as well as different methods of cryopreservation on the structure of DNA organization in the human sperm. 19 sperm samples obtained from healthy men with normozoospermia (according to the criteria of the World Health Organization) were used for investigation. A significant increase of human sperm DNA-fragmentation was observed after 8 hours of incubation at +39°C (by 76.7%) and at +37°C (by 68.9%). It was found that sperm cooling with the use of a cryoprotectant immediately after thawing did not produce significant differences in the extent of DNA fragmentation, although samples, containing cryoprotectants, showed a sharp increase of DNA fragmentation after 24 hours of incubation, that could suggest cryoprotectant cytotoxicity.

*Key words:* DNA fragmentation, spermatozoa, assisted reproductive technology, cryopreservation, incubation temperature