

На правах рукопису

ЛУЧКО НІНА АНТОНІВНА

ВПЛИВ УМОВ ПОНАДШВИДКОГО ОХОЛОДЖЕННЯ НА
МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ СПЕРМІЇВ
ТА ЕМБРІОНІВ

03.00.22 - кріобіологія

А в т о р е ф е р а т

дисертації на здобуття вченого ступеня
доктора біологічних наук

Харків - 1997

110 58. 364
Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і
кріомедицини НАН України

Науковий консультант - В.І.Грищенко,
академік НАН України,
засл. діяч науки і техніки
України,
лауреат Державних премій
СРСР і України

Офіційні опоненти А.І.Гладкова,
доктор біологічних наук,
професор

Є.Є.Перський,
доктор біологічних наук

А.О.Цуцаєва,
доктор медичних наук,
професор

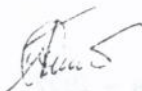
Ведуча організація - Київський Інститут фізіології
ім.О.О.Богомольця НАН України

Захист відбудеться " _____ " _____ 1997 року
о _____ годині на засіданні спеціалізованої ради Д 016.60.01
при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України
/м.Харків, вул.Переяславська, 23/.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту.

Автореферат розісланий " 22 " _____ мая _____ 1997 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради,
доктор медичних наук,
професор



А.М.Гольцев

ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00751201 (G)

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

На правах рукопису

ЛУЧКО НІНА АНТОНІВНА

ВПЛИВ УМОВ ПОНАДШВИДКОГО ОХОЛОДЖЕННЯ НА
МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ СПЕРМІЇВ
ТА ЕМБРІОНІВ

03.00.22 - кріобіологія

А в т о р е ф е р а т

дисертації на здобуття вченого ступеня
доктора біологічних наук

Харків - 1997



ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. У зв'язку з несприятливим впливом навколишнього середовища на організм людини на різних етапах постнатального розвитку і особливо у період статевого дозрівання, статевої зрілості зростає кількість безплідних шлюбів і складає 12-18%. Розв'язати цю соціальну проблему можна лише при використанні різних штучних способів зачаття /штучної інсеминації, трансплантації ембріонів/, які неможливі без довгострокового зберігання сперми і ембріонів людини. З цієї метою єдиним методом є криоконсервування, яке викликане не тільки широкомасштабним використанням для лікування безплідності, але також і необхідністю збереження генофонду у зв'язку з погіршенням екологічних умов і розповсюдженням СНІДу, з необхідністю створення криобанків репродуктивних клітин для осіб, що працюють у зонах з підвищеною радіацією / Sherman J.K., 1988; І.Ф.Юнда, Л.М.Іванюта, Л.П.Імшинецька, 1990; Gao D.Y., Mazur P., Kleinhans F.W. et al., 1992/.

Широко використовуються для консервування гамет повільні швидкості їх охолодження по етапній програмі /Ф.І.Осташко, 1978; В.А.Наука, 1991/. Швидкість охолодження сперми людини в основних способах їх криоконсервування обмежена $-16-25^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. / Sherman J.K., 1978; Varkey J., Zackerman H., 1982; В.І.Гриценко, Ю.С.Паращук, А.С.Капрельянц, 1984/. Концентрації гліцерину 1,0-1,5 М у застосованих способах є робочими, однак показано, що в концентрації 0,5 М гліцерин в суспензії сперміїв може депонуватись у мембрані і приводити до появи в ній дефектних зон, до зниження схоронності гамет після їх криоконсервування /Strazek J., Toraka Y., Grogowski., 1983; Hammersted R.H., Graham J.K., 1992/. У криобіологічній практиці немає

реальних способів кріоконсервування сперми людини, які б дозволили розгорнути клінічну роботу по інсемінації кріоконсервованою спермою у тих масштабах, які продиктовані запитамі клінічної медицини.

Фізичні уявлення про кінетику обезвожування ембріонів стали основою для твердження про необхідність охолодження в середовищі, яке містить 1-2 М концентрації кріопротекторів: глицерину, 1,2-пропандіолу, Me₂SO / Leibo S.P., Mazur P., 1974; Kasai M., 1980; Szell A., Shelton J.N., 1986; Zeilmaker J.H., Alberda van Jent et al., 1984; Leibo S.P., 1992/. Однак при цьому кріоконсервування ембріонів пов'язане з тривалим перебуванням у екстремальних умовах все зростаючої гіперосмолярності, що приводить до збільшення токсичності середовища і, таким чином, до зниження зберігання клітин. Поряд з тим рутинний підхід до кріоконсервування ембріонів потребує використання складного в експлуатації обладнання, тоді як одна із сучасних вимог, що пред'являється до таких розробок є, поряд з ефективністю, спрощення їх реалізації / Trounson A., 1986/. Процес кріоконсервування є по суті процесом переводу біологічного об'єкту у стан глибокого холодого анабіозу. На етапах цього процесу реалізуються такі фізико-хімічні фактори, як холодовий шок, кристалізація, гіперконцентрація розчинів, які можуть викликати загибель біологічних об'єктів /А.М.Білоус, В.І.Грищенко, 1994; А.О.Пущасва, Ю.Ю.Мікулінський, І.П.Висеканцев та інш., 1991; А.М.Білоус, Є.О.Гордієнко, Л.Ф.Розанов, 1987; В.А.Бондаренко, Т.А.Бондаренко, С.В.Руденко, 1992; Т.М.Юрченко, В.Ф.Козлова, Б.А.Скорняков та інш., 1989/. У зв'язку з цим зроблені спроби скоротити період знаходження ембріонів в умовах гіперосмолярності середовища, що досягається, поряд із зменшенням тривалості еквилібрації клітин у середовищі кріоконсерванту, знач-

ним збільшенням швидкості їх охолодження шляхом прямого занурювання заморожених зразків у рідкий азот при підвищенні сумарної концентрації кріопротекторів до 50-70% / Rall W.F.,

Fahy G.M., 1985; Biery K.A., Seidel G.E., Jr, Elsdon R.P. 1986; В.І.Грищенко, Ф.І.Осташко, Є.Ф.Ісаченко та інш., 1992; Renard J.P., 1986; Surrey E.S., Quinn P.J., 1990/. У цих ситуаціях, на думку авторів, відбувається вітрифікація рідких фаз у системі. Однак при цьому істотно підвищити відсоток збереження ембріонів і їх приживлення не вдалося / Trounson A.,

Peura A., Kirby C., 1987/, так як при використанні вітрифікуючих розчинів збільшується ризик токсичного впливу високих концентрацій кріопротекторів. Незважаючи на те, що подібні підходи не мають явної переваги перед рутинними способами, однак вони свідчать про стійко намічені тенденції переходу від повільних режимів їх охолодження до швидких через очевидну перспективу останніх. Поряд з тим, розрахункові дані розміру гідравлічної провідності мембрани сперміїв людини для молекул води, переконувть, що межа оптимального режиму охолодження цих клітин при низькій концентрації у середовищі заморожування гліцерину, має знаходитись у діапазоні порядку 7000°C/хв / Nollles E.E., Mazur P., Kleinham P.W., 1992/.

У зв'язку з цим безперечний інтерес має пріоритетна робота українського вченого В.І.Смирнова /1949/, який показав принципову можливість зберігати морфофункціональні властивості сперміїв більшості сільськогосподарських тварин шляхом заморожування гамет без кріопротекторів у мікрооб'ємі 0,02 мл при швидкості охолодження 5000°C/хв. Надмірно малий об'єм заморожуваних суспензій сперми і нетривала їх схоронність стали перешкодою для впровадження цього методу у практику. В умовах понадшвидкого охолодження вдалось здійснити кріоконсервування

генатоцитів, фрагментів шкіри і амніотичної оболонки /В.Ф.Тарасов, 1988; С.Є.Гальченко, 1990; Н.П.Субота, 1994/.

Застосування понадвидкого охолодження для збереження сперми і ембріонів відкриває новий шлях підвищення ефективності процесу їх кріоконсервування з урахуванням невеликих, але достатніх для використання у практиці об'ємів матеріалу.

Слід зазначити, що переважна більшість фундаментальних і прикладних досліджень в галузі кріобіології присвячена характеру впливу механізмів індукції і репарації кріопшкоджень у біологічних об'єктах при використанні швидкостей охолодження у діапазоні від $0,1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до $300\text{--}400^{\circ}\text{C}/\text{хв}$.

Дослідження по вивченню перелічених проблем в області кріобіології при використанні понадвидкого охолодження на етапі переведення біологічних об'єктів і, особливо сперми і ембріонів, у стан глибокого холодого анабіозу поодинокі. Враховуючи їх перспективність і відсутність альтернативних способів кріоконсервування гамет, доцільна розробка принципово нового наукового напрямку у кріорепродуктології, яке дозволило б розробити високоефективні засоби кріоконсервування цих клітин.

Мета і завачі дослідження. Метою роботи є вивчення деяких закономірностей і провідних механізмів кріопшкодження і кріозахисту сперміїв і ембріонів в умовах понадвидкого охолодження і застосування композиційних кріоконсервантів з низьким вмістом кріозахисних сполук, які мають різні фізико-хімічні властивості. Це необхідно для обґрунтування нового підходу до реалізації кріозахисту вказаних видів клітин, і створення на цій основі високоефективних способів кріоконсервування, які можуть бути основою для розробки оригінальних технологічних процесів кріоконсервування гамет та ембріонів.

Для досягнення даної мети передбачається розв'язати такі задачі:

1. Оцінити цитотоксичність вибраних хімічних сполук щодо спермій і ембріонів, визначити найбільш перспективні з них для наступного вивчення їх криопротекторних властивостей.

2. Вивчити ефективність переходу ембріонів і сперми у стан глибокого холодого анабіозу в залежності від швидкості охолодження і зміста багатокомпонентного криоконсерванту в умовах багатфакторного експерименту.

3. Вивчити криозахисну ефективність компонентів криоконсервантів при охолодженні ембріонів і спермій.

4. Визначити ефективність використання мембраностабілізуючих холінопохідних речовин у складі криоконсервантів при понадшвидкому охолодженні репродуктивних клітин.

5. Вивчити характер впливу зберігання спермій і ембріонів при їх понадшвидкому охолодженні у середовищі багатокомпонентного криоконсерванту, а також адаптації спермій і ембріонів до низьких позитивних температур і визначити температурні і тимчасові параметри еквилібраційного періоду.

6. Дослідити ступінь виразності криозахисної ефективності гліцерину і його алкілпохідних щодо спермій у залежності від значення гідрофільно-ліпофільного балансу хімічних сполук.

7. Вивчити характер впливу оптимальних умов уводу репродуктивних клітин і ембріонів у стан глибокого холодого анабіозу в умовах понадшвидкого охолодження на збереження їх мембран, а також на рівень біосинтезу білка, ДНК, РНК - для ембріонів і активності акрозину і глікозо-6-фосфатдегідрогенази /Г6ФДГ/ - для спермій людини.

8. Розробити вискоелективні, рентабельні, прості в реалізації способи криоконсервування спермій і ембріонів в умовах

використання багатоконпонентного кріоконсерванту і понадшвидкого охолодження.

9. Провести порівняльне вивчення трансплантації нативних і кріоконсервованих ембріонів мишам-реципієнтам і оцінити запліднюючу здатність сперми людини, кріоконсервованої з понадшвидким охолодженням.

Наукова новизна. Вперше обгрунтовані і сформульовані основні положення наукового напрямку у кріобіології-репродуктології, заснованого на вивченні механізмів кріопшкодження і кріозахисту спермій і ембріонів при використанні їх понадшвидкого охолодження у багатоконпонентному кріоконсерванті, що дозволило вперше розробити спосіб широкомасштабного впровадження в клініку для боротьби з безпліддям різної етіології.

Вперше науково обгрунтовано альтернативний існуючому ефективний спосіб переведу біологічних об'єктів, ембріонів і гамет у стан глибокого холодого анабіозу, за допомогою понадшвидкого охолодження і застосування багатоконпонентного кріоконсерванту з низьким вмістом у ньому кріопротекторів.

Вперше встановлено, що в залежності від особливостей морфофункціональних властивостей спермій і ембріонів існують оптимиуми понадшвидкого їх охолодження.

Показано, що ступінь морфофункціонального збереження репродуктивних клітин залежить від оптимального поєднання режиму їх понадшвидкого охолодження і складу поліфункціонального кріоконсерванту.

Вперше встановлена залежність між кріозахисною активністю гліцерину та його алкілшохідних щодо спермій і значеннями гідрофільно-ліпофільного балансу у молекулах цих сполук, що стало основою як для науково обгрунтованого підходу до трактування особливостей їх кріозахисної дії щодо репродуктивних клітин,

так і для створення для них ефективних кріоконсервантів.

Вперше на основі комплексного дослідження морфофункціональних властивостей спермій і ембріонів, кріоконсервованих з понаддивидким охолодженням, включаючи вивчення нуклеїнових кислот, активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази і акросомального ферменту, білоксинтезуючої активності клітин, цілісності їх цитоплазматичної мембрани і акросомального апарату, оцінки розвитку ембріонів у культурі, розкриті деякі особливості механізмів кріопшкодження і кріозахисту цього виду клітин при їх понаддивидкому охолодженні у середовищі багатоконпонентного кріоконсерванту.

Вперше показано, що мембранотропні похідні холіну мають різну активність як компоненти кріоконсерванту.

Розроблені оригінальні технологічні процеси переводу гамет і ембріонів у стан глибокого холододового анабіозу за допомогою понаддивидкого охолодження з високим ступенем зберігання морфофункціональних властивостей, що необхідні клініцистам-репродуктологам. Ці засоби не мають аналогів за кордоном, захищені патентами, легко реалізуються, засновані на сполученні понаддивидкого охолодження, що досягається за допомогою принципово нового підходу до його реалізації і низького вмісту у кріоконсерванті кріопротекторів та мембраностабілізувальної речовини.

Теоретичне і практичне значення роботи.

I. У процесі комплексних досліджень вивчені загальні закономірності кріопшкодження і кріозахисту спермій і ембріонів в умовах понаддивидкого охолодження і дії багатоконпонентного кріоконсерванту з включенням до його складу мембраностабілізуючих речовин. Це розширило існуючі уявлення про роль фізичних і хімічних факторів у реалізації кріозахисту репродук-

тивних клітин і ембріонів і дозволило обґрунтувати нові підходи до підвищення їх зберігання в умовах глибокого заморожування.

2. На прикладі включення до криоконсерванту алкілпохідних гліцерину показано вплив зміни гідрофільно-ліпофільного балансу в криобіологічній системі на ефективність криозахисту. Встановлена кореляція між криопротекторними властивостями щодо спермій і ембріонів при їх понаддивидкому охолодженні і вказаним фізико-хімічним параметром гліцерину та його алкілпохідних сполук. Визначена межа, до якої можливе збільшення гідрофобності криопротекторів у відношенні репродуктивних клітин без зниження їх криозахисних властивостей. Це дозволило вивчити деякі особливості інтегрального криозахисту репродуктивних клітин і ембріонів, а також їх окремих структур при понаддивидкому охолодженні цих біооб'єктів у середовищі хімічних сполук з спрямованою зміною фізико-хімічних властивостей, що послужило основою для розробки високоефективних криоконсервантів для цих клітин.

3. Встановлено, що місцем прикладення осмотичних сил у криобіологічній системі в умовах її понаддивидкого охолодження перш за все є цитоплазматична мембрана репродуктивних клітин. Вивчення впливу на цитоплазматичну мембрану спермій і ембріонів мембраностабілізуючих речовин /холінів/ дало можливість визначити шляхи спрямованої корекції морфофункціонального стану клітин в умовах їх понаддивидкого заморожування.

4. Дослідження залежності між схоронністю спермій і ембріонів, визначеної з комплексу морфофункціональних тестів, включаючи оцінку цілісності мембран клітин за допомогою флуоресцентних зондів, активності ряду локалізованих у ній і в клітинах ферментів визначення акрозіну і Г6ФДГ, біосинтезу

РНК, ДНК, білка і температурно-тимчасовими параметрами процесів адаптації і еквілібрації, а також складом кріоконсерванту, режимами понадшвидкого охолодження, дозволили вивчити деякі особливості кріопшкоджень і кріозахисту цих клітин в умовах понадшвидкого охолодження, розробити основні принципи ефективного зберігання цього виду клітин при їх консервуванні.

5. Знайдені закономірності дії на репродуктивні клітини і ембріони понадшвидких охолоджень і композиційних кріоконсервантів дозволили розробити високоефективні способи кріоконсервування цього виду клітин, які відрізняються простотою реалізації і економічністю і дозволяють зберегти їх на рівні нативних і повністю задовольнити попит клінічної практики у репродуктивному матеріалі на сучасному етапі.

6. Спосіб кріоконсервування спермій з понадшвидким охолодженням впроваджено в клінічну практику в Україні і в Росії. Ефективність впровадженого засобу кріоконсервування репродуктивних клітин була підтверджена високим відсотком вагітності, яка закінчувалась народженням повноцінних дітей, після використання клітин як для штучної інсемінації спермою донора і чоловіка, так і у програмі ОІВ для штучного запліднення ооцитів.

7. Лікувальним установам була надана практична допомога в організації кріобанків репродуктивних клітин при лікуванні безпліддя різної етіології. Організація кріобанків сперми донорів полегшила роботу по їх добору індивідуально для кожної пацієнтки, згідно з фенотипічними ознаками, групою крові, резусом-належності та іншими ознаками, а також дала можливість тривалий час зберігати репродуктивні клітини в умовах глибокого охолодження, що дозволило обстежити сперму по ряду тестів, включаючи дослідження на СНІД і гепатит.

8. На основі матеріалів виконаних робіт отримано 20 патен-

тив (США, Великої Британії, ФРН, Франції, Японії, Росії і України).

9. Показана перспективність подальшого розширення досліджень для розробки технології кріоконсервування сперми і ембріонів в умовах понадшвидкого охолодження.

Основні положення, які виносяться на захист.

1. Розроблено новий напрямок у кріобіології-репродуктології, заснований на понадшвидкому охолодженні клітин у середовищі поліфункціонального кріоконсерванту з низьким вмістом компонентів.

2. Встановлен вплив понадшвидкого охолодження на схороненість репродуктивних клітин і ембріонів.

3. В умовах понадшвидкого охолодження показана доцільність застосування композиційних кріоконсервантів, які містять низькі концентрації ендоселюлярних і змішаної дії кріозахисних сполук і мембраностабілізуючої речовини.

4. Кріопротекторна активність алкілзаміщених гліцерину визначається значенням фізико-хімічного параметру - гідрофільно-ліпофільному балансу при понадшвидкому охолодженні репаративних клітин.

5. З метою максимального зниження негативного впливу на мембрани фізико-хімічних факторів, які реалізуються на етапах кріоконсервування біологічних об'єктів з понадшвидким охолодженням, до складу кріоконсерванту включені мембраностабілізуючі сполуки з числа холінів.

6. Після консервування ембріонів за допомогою оптимальних режимів при понадшвидкому охолодженні у них розвиваються не-летальні репаруємі пошкодження. Це виходить із динаміки вивчення біосинтезу ДНК, РНК, білка у ембріонах, які перенесли понадшвидке охолодження і подальше культивування.

7. Комплексні дослідження цільності сперміїв і ембріонів проведені на всіх етапах циклу кріоконсервування, дозволили науково обґрунтувати оптимальні умови, які необхідні для успішного їх заморожування з метою тривалого зберігання і клінічного застосування.

Апробація роботи. Основні матеріали дисертаційної роботи обговорені і отримали схвалення на міжнародних конференціях:

1. The Society for cryobiology. International meeting. Cryo 1991. 28 th Annual Meeting, 7 - 12 July, 1991. - Leuven
2. 7 Symposium uder Problem der Tieftemperatur Konservierung Zellen, Geweben und Organen, Berlin, 6 - 8 May, 1991
3. Current progress in cryobiology. International Conference, 21- 25 April, 1992, Kharkov, Ukraine
4. Наукова конференція. Інститут репродуктивної генетики, м.Чікаго, США, 1992.
5. З'їзд українського товариства кріобіології і кріомедицини 18-20 жовтня 1995, м.Харків, Україна, 1995.
6. The Society for cryobiology. International meeting Cryo 1997. 34 th Annual Meeting . 8 - 12 June, 1997

Публікації матеріалів дослідження. За матеріалами дисертації опубліковано 40 робіт, із них 12 статей, 18 патентів (США, Франції, Великої Британії, ФРН, Японії, Росії і України).

Обсяг та структура дисертації. Робота виконана у рамках теми 2.2.6.66 "Вивчити механізм підвищення фертильності гамет і стійкості фетальних клітин людини і тварин при впливі низьких температур в сполученні з іншими фізико-хімічними факто-

рами".

Дисертаційна робота складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, 6 глав власних досліджень і їх обговорення, закінчення, висновків і списку літератури, які містять 555 джерел, із них 194 вітчизняних і 361 зарубіжних.

Робота викладена на 252 сторінках машинописного тексту, крім того ілюстрована 25 малюнками і 55 таблицями.

Матеріали і методи дослідження.

Об'єкти дослідження.

Ембріони. Для роботи використали лінійних мишей $C_{57}Bl/6$, SwA/Has , $F_1/SwA \times C_{57}Bl/6$, SwA . З метою збільшення кількості передімплантаційних ембріонів овуляцію стимулювали гонадотропінами: /ГСЖК/ - гонадотропін сироватки жеребої кобили і ХГ /людський хоріогонічний гонадотропін/, вводячи їх самицям перед спарюванням по класичній схемі /А.П.Дибан, 1974/. Ембріони вимивали із репродуктивних шляхів на стадії морули на 3, 5 день після спарювання.

Сперма донорів. Сперму одержували від здорових мужчин. Еякуляти збирали шляхом мастурбації через 48 годин сексуальної абстиненції в чашки Петрі і після 30-хвилинного розрідження у термостаті при $+37^{\circ}C$ сперму застосовували в експериментах / MacLeod, Gold., 1951/.

Оцінка схоронності ембріонів. Об'єктом дослідження були ембріони на стадії морули до і після кріоконсервування. Їх морфологічна оцінка здійснювалась за допомогою біокулярної лупи МБС-9 і мікроскопу (Biolar) /Манк, 1990/. В дослідках були використані морфологічно повноцінні ембріони. Культивування ембріонів до і після кріоконсервування проводили в інкубаторі у середовищі ХЕМаF-10, в модифікованому середовищі Віттена з добав-

ков Нере⁸, по методиці О.П.Березовської, Л.М.Межевікіної, Б.Н.Вепренцева /1986/. Активність процесів біосинтезу ДНК, РНК, білка вивчали за допомогою помічених попередників ³H-тимідину, ³H-уридину і ³H-лейцину, відповідно/ Anderson G.B., Foot R.H., 1975/. Цитотоксичність хімічних з'єднань алкілзаміщених гліцерину вивчали після одноденної їх експозиції з ембріонами при +22°C /А.П.Дибан, 1985/. Ембріони відмивали від кріопротекторів середовищем культивування і переносили у використовуване культуральне середовище.

Цілісність цитоплазматичних мембран. визначали за допомогою флуоресцентних зондів, з використанням етидіум броміда /ЕБ/ і аніліно-нафталін-8-сульфонату /АНС/ згідно з рекомендаціями Є.Я.Мельникової, В.Н.Карнаухова, В.А.Дриняєва і інш. /1982/. Флуоресценцію оцінювали за допомогою мікрофлуориметра МФ-2 при довжині хвилі флуоресценції 610 і 570 Нм, відповідно.

Трансплантацію інтактних і розморожених ембріонів на стадії морули здійснювали хірургічним методом у ріг матки псевдовагітним мишам лінії С1/ВА /А.П.Дибан, 1974/. Народження мишенят фіксували на 21 день після трансплантації. Трансплантацію у матку інтактних і розморожених ембріонів нехірургічним методом проводили по методичним рекомендаціям /М.Н.Зубін, Б.Н.Вепренцев, 1988/.

Вивчення схоронності сперміїв.

Кількість рухомих сперміїв визначали під мікроскопом при збільшенні x 500 у термостатируючій камері при температурі +37°C і розраховували по відношенню до всієї кількості сперміїв у % /М.А.Кунін, 1973/. У роботі використали еякуляти, в яких є понад 40% нормальних морфологічних форм /Манк М, 1990/.

Концентрацію сперміїв визначали шляхом підрахунку їх кіль-

кості у камері Горяєва і визначали в млн. в 1 мл сперми /Брауде, 1990/.

Акроскопічний тест. Метод заснований на ефекті відбитого світла, яке проходить через темнопільний конденсор, який дозволив оцінити стан акросоми /І.І.Соколовська, Г.Б.Бронська, А.Д.Суботін та інш., 1985/.

Час переживання сперміїв визначали в годинах, визначаючи через кожну годину, протягом 6 годин, інкубації при температурі $+22^{\circ}\text{C}$ кількість рухомих сперміїв /В.К.Мілованов, 1962, С.І.Сердюк, 1977/.

Вискивасмість сперміїв після розморожування оцінювали у відсотковому відношенні числа активно рухомих гамет після відігріву до числа активно рухомих сперміїв до заморожування і визначали у % / Guerin Y., Menezo W., Szuba A., 1979/.

Цитотоксичність визначали шляхом підрахунку рухомих сперміїв до і після інкубації при $+37^{\circ}\text{C}$ в кріоконсерванті без і при включенні до його складу кріопротекторів /В.І.Грищенко та інш., 1987/.

Активність акрозину оцінювали за допомогою колориметра КФК шляхом нефелометричного визначення кількості казеїну нерозщепленого ферментами, екстрагированими при заданих умовах із гамет /І.І.Соколовська, А.Б.Бронська, А.Д.Суботін і інш., 1980/.

Активність глюкозо-6-фосфатгліцерогенази /Г6ФЛГ/ визначали на спектрофотометрі СФ-5 відповідно з Guerin Y., Menezo W., Szuba A., 1979 по зміні швидкості відновлення НАДФ в інкубаційному середовищі при насичених концентраціях субстратів і кофакторів, оптимальному значенні рН і концентрації ферментативного білка і визначали в активності фермента у Нмолях

НАДФ Н, яка утворювалась за 1 хвилину в розрахунку 10^9 спермійв.

Запліднюючу злібність спермійв оцінювали сумісно з співробітниками кафедри акушерства і гінекології Харківського Державного медичного університету по настанню вагітності реципієнтки після їх штучної інсемінації суспензією розморожених клітин.

Контейнери для кріоконсервування спермійв обсягом 0,5 мл і ембріонів - 0,3 мл виготовляли із харчової фольги апірогенної, нетоксичної, стерильної, одноразового використання.

Кріоконсервування ембріонів і спермійв. Заморожування спермійв і ембріонів проводили у контейнерах по розробленим методикам /В.І.Грищенко, Ю.В.Калутін, Н.А.Лучко, Є.Н.Черниш, 1985; В.І.Грищенко і інш., 1988/ з використанням поліфункціональних кріоконсервантів і понаддивидких охолоджень, які досягались шляхом занурювання контейнерів з біоматеріалом в охолоджені до температури рідкого азоту порошки металів. В залежності від поставленого завдання змінювали кріоконсервант і діапазон понаддивидкого охолодження.

Дослідження тимчасових і температурних параметрів еквілібрації і адаптації спермійв і ембріонів здійснювалось у діапазоні температур $+4^{\circ}\text{C}$ - $+22^{\circ}\text{C}$ і тимчасовому інтервалі до 60, 90 хв при швидкостях охолодження клітин в діапазоні від 3000 К/хв до 9000 К/хв. Розморожування спермійв і ембріонів здійснювали занурюванням контейнерів з кріоконсервованим біоматеріалом у водяну баню при $+41^{\circ}\text{C}$. В усіх дослідках в якості контролю використали нативні клітини /спермії, ембріони/.

В дослідженнях були використані реактиви фірми "Serva", "Совзреактивхім", "Реанал" чистоти о.с.ч, х.ч.. ч.д.а. і фармакопейні препарати, у тому числі холіна-хлорид, ацетілхолін і карбохолін, а також кріопротектори: гліцерин, 1,2-пропандіол,

ДМСО.

Алкілзамінені провідні гліцерину І-монометиловий ефір гліцерину /І-ММЕГ/, І-моноетиловий ефір гліцерину /І-МЕЕГ/, І,3-діметиловий ефір гліцерину /І,3-ДМЕГ/ були синтезовані /С.В.Коцкій, Л.А.Ханіна, 1990/, очищені і піддані ідентифікації відділом кріопротекторів ІПК і К НАН України /зав.відділом, д.б.н., проф. В.Й.Луговий/ після чого були люб'язно представлені нам для проведення досліджень.

Статистична обробка даних здійснювалась по методу Фішера-Ст'юдента /Є.К.Меркур'єва, 1964, І.П.Ашмарін, Н.Н.Васил'єв, В.А.Амбросов, 1975/.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

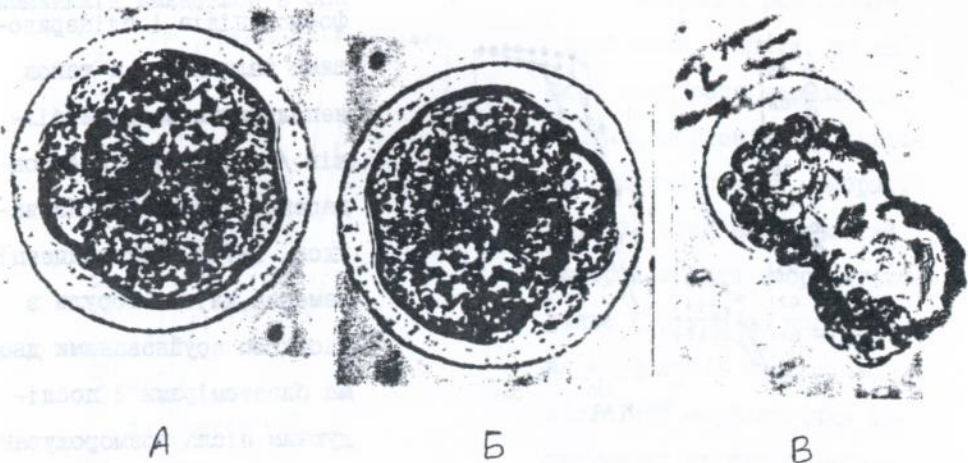
Відомо, що підвищення швидкості заморожування будь-яких біооб'єктів, включачи спермії і ембріони, дозволяє знизити утримання в середовищі заморожування будь-яких хімічних компонентів, які в робочих концентраціях використовуються в більшості існуючих засобів і негативно відбиваються на життєздатності клітин ще до їх охолодження. В зв'язку з цим є доцільним досліджувати цитотоксичність деяких речовин, які включені у склад кріоконсерванту при понадшвидкому переводі біологічних структур у стан глибокого анабіозу.

У результаті досліджень цитотоксичності ряду з'єднань, застосованих у експериментах, встановлено, що доцільно використати для кріозахисту сперміїв і ембріонів гліцерин і його алкільні похідні в концентрації не більш 0,5 м.

В умовах повного факторного експерименту при варіюванні кількістю компонентів, їх вмістом в кріоконсерванті і понадшвидким охолодженням ембріонів встановлено, що при включенні у склад кріоконсерванту 20% гліцерину і 0,5 М сахарози при швид-

костях охолодження - 9000 К/хв, після розморожування, кількість схоронених ембріонів була максимальною, але не перевищувала 49,16%. Треба думати, що це пов'язано з надмірною дегідратацією клітин і пошкоджуючою дією "ефекту розчину" при недостатньому криозахисті ендоцеллярних структур в даних умовах. Це підтверджено результатами наступної серії дослідів, коли у склад криоконсерванту були введені криопротектори: гліцерин і 1,2-пропандіол в концентрації не більш 0,5 М кожного, а в число компонентів не входила сахароза. Максимальна схоронність ембріонів досягалась при вказаному складі криоконсерванту і швидкості охолодження 9000 К/хв і складала 60,5%. Одержані результати свідчать про те, що ведучу роль при розробці ефективних умов криоконсервування поряд з понадшвидким охолодженням, відіграють криопротектори, які з різною швидкістю проникають у клітини. Так, введення у склад криоконсерванту, поряд з гліце-рином і 1,2-пропандіолом, Me_2SO в низькій концентрації не більш 0,5 М, дозволило досягти підвищення схоронності ембріонів до 78,45%. Однак для того, щоб одержати максимальну схоронність, яка досягає 94,86% розвитку в культурі /мал.І/, ураховуючи, що поруч з дією гіперконцентрованих розчинів і можливим розвитком внутріклітинної кристалізації /Є.Ф.Гордієнко, Л.Ф.Розанов, 1996/ при понадшвидкому охолодженні ембріонів місцем прикладення осмотичного фактору є цитоплазматична мембрана, у трьохкомпонентний криоконсервант була введена в оптимальній концентрації мембраностабілізуюча речовина - холіна-хлорид. Його криозахисна ефективність, досліджена в умовах повного факторного експерименту, виявилась вищою, ніж у ацетілхоліну і карбохоліну.

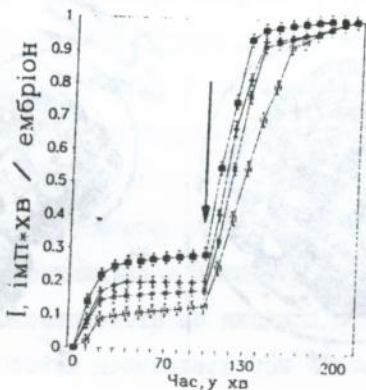
Можлива пошкоджуюча дія понадшвидкого охолодження у відношенні цитоплазматичної мембрани привела до необхідності деталь-



Мал.І. Морфологія ембріонів до і після криоконсервування по оптимальній програмі: А - до криоконсервування; Б - після розморожування; В - після розморожування і розвитку в культурі до стадії виходу бластоцисти.

но вивчити її скоронність, а також бластомірів ембріонів за допомогою флуоресцентних зондів: АНС і ЕБ, показано, що після заморожування-відтавання цих клітин на стадії морули, інтенсивність флуоресценції мембран ембріонів вірогідно підвищується на протязі 20 хвилин, після додатку в них зонду АНС. Це характерно для ембріонів при відмінному ступені їх морфологічної скоронності в порівнянні з контролем /мал.2/.

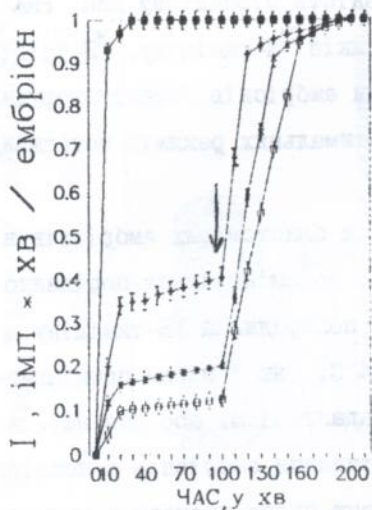
При максимальній скоронності ембріонів ступінь флуоресценції мембран клітин у випадку вказаного часу вірогідно, але незначно відрізнялась від інтенсивності флуоресценції інтактних клітин. Збільшення флуоресценції мембрани криоконсервованих клітин можна пояснити зміною її фізико-хімічних властивостей. Це можливо здійснюється за рахунок латеральної сепарації ліпідів і збільшенням кількості місць зв'язування зонду



Мал.2. Вплив заморожування-відтавання на флуоресценцію ембріонів з АНС відмінного ступеня їх морфологічної зхоронності. □ -нативні ембріони; морули після розморожування; ☆ -з чітко визначеними бластомірами, + -з частковим руйнуванням двох бластомірів, ■ -з повним руйнуванням двох бластомірів, ↓ -флуоресценція після додатку детергенту.

зміна властивостей мембран клітин незначна і легко репарується в процесі культивування. Інтенсивність флуоресценції мембран клітин ембріонів з повним руйнуванням в них двох бластомірів вірогідно $(p < 0,05)$ на 46,7% перевищувала флуоресценцію мембран клітин, які перенесли криоконсервування без видимих змін. В порівнянні з останніми у випадку пошкодження 50% бластомірів інтенсивність флуоресценції мембран клітин збільшилась вірогідно більш ніж у 2 рази /мал.3/. Руйнування в процесі заморожування-відтавання усіх бластомірів ембріона додає кривій флуоресценції вертикальну направленість.

АНС з полярними ділянками фосфоліпідів і гліцериновими залишками, а також неполярними зондами білків /А.М.Білоус, В.А.Бондаренко, 1978, В.Н.Карнаухов, 1976/. Флуоресценція мембран клітин морули з частково зруйнованими двома бластомірами і послідовним після розморожування культивуванням /мал.2/ не мала на етапі першого підвищення її інтенсивності і вираженого плато вірогідних відрізнь в порівнянні з непошкодженими ембріонами після розморожування. Це зв'язано, треба припустити, з тим, що



Мал.3. Вплив криоконсервування на інтенсивність флуоресценції /з АНС/ ембріонів /стадія морули/ при 50% і 100% зруйнованих бластомірів: □ -нативні ембріони; * -ембріони після криоконсервування; + -ембріони з 50% зруйнуванням бластомірів; ■ -ембріони з повністю зруйнованими бластомірами; ↓ -флуоресценція після додатку детергенту.

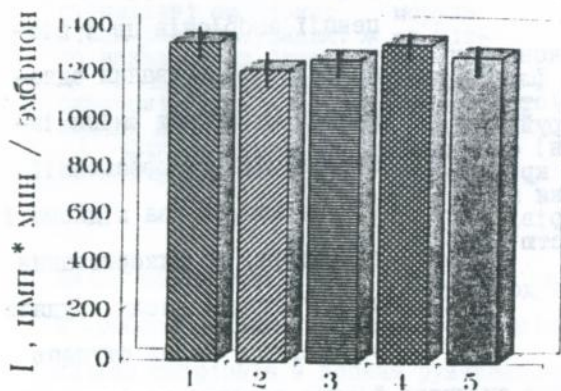
флуоресценції, детергенти змінюють фізико-хімічні властивості компонентів мембран, криоконсервованих клітин у більшому ступені ніж нативних. Можна припустити, що детергенти дозволяють виявити нелетальні пошкодження, які розвиваються в мембранах після криоконсервування. Одержані результати свідчать про те, що зміна фізико-хімічних властивостей мембран у результаті понадшвидкого охолодження розвивається в динаміці.

Одержані результати дозволили виявити, що на фоні порушення морфології клітин ембріонів, змінюються властивості їх мембран. Ступінь змін властивостей мембран клітин ембріону корелює з ступенем порушення морфології клітин, з кількістю морфологічно пошкоджених клітин в ембріоні.

У всіх ситуаціях характер кривих зміни флуоресценції ембріонів до і після криоконсервування однаковий. На кривих зміни інтенсивності флуоресценції відзначається два підйома і два плато, до використання детергентів і після. Судячи по характеру зміни ступеню

В особливих серіях експериментів вивчався вплив різних етапів кріоконсервування на активність біосинтезу ДНК, РНК та білка по даним включення попередників ^3H -тимідину, ^3H -урідину і ^3H -лейцину, відповідно в клітини ембріонів /стадія морули/, кріоконсервованих за допомогою оптимальних режимів понадшвидкого охолодження.

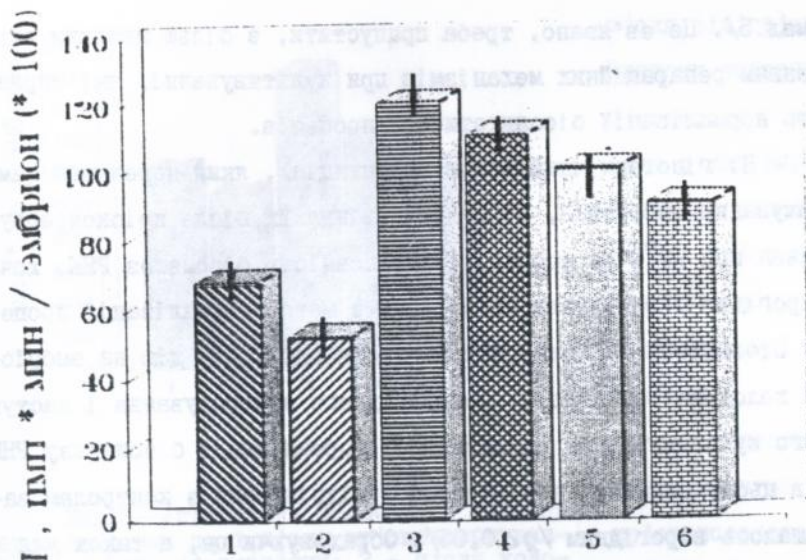
Інтенсивність біосинтезу ДНК в бластомірах ембріонів в усіх проведених серіях вірогідно не змінювалась порівняно з контролем. Включення наміченого попередника ^3H -тимідину в ембріони як після адаптації при $+4^\circ\text{C}$, так і після понадшвидкого заморожування з попередньою адаптацією, або без неї, а також у випадку заморожування-відтавання ембріонів з послідовним культивуванням відповідало рівню цього процесу в нативних клітинах /мал.4/.



Мал.4. Включення попередників ДНК ^3H -тимідину в клітини ембріонів да і після кріоконсервування: 1 - нативні ембріони; 2 - після холодової адаптації; 3 - після кріоконсервування по оптимальній програмі; 4 - після кріоконсервування з холодовою адаптацією; 5 - культивування після розморожування.

кого охолодження збільшується на 64% / $p < 0,05$ /, що, можливо, зв'язано із зміною біосинтетичних процесів деяких специфіч-

При дослідженні біосинтезу РНК в ембріонах встановлено, що холодова адаптація ембріонів протягом 1 години при $+4^\circ\text{C}$ вірогідно, але незначно, подавляла біосинтез РНК у них /мал.5/. Звертає на себе увагу той факт, що інтенсивність біосинтезу РНК після понадшвид-



Мал.5. Включення попередника ³H-урідину в клітинах ембріонів до і після криоконсервування: 1 - нативні ембріони; 2 - після холодової адаптації; 3 - після криоконсервування по оптимальній програмі; 4 - після криоконсервування з попередньою холодовою адаптацією; 5 - культивування ембріонів після розморожування без холодової адаптації перед консервуванням; 6 - попередня 1-годинна холодова адаптація перед криоконсервуванням ембріонів і додаткове 1-годинне їх культивування після консервування.

них білків, які беруть участь в репараційних процесах. Холодова адаптація з подальшим криоконсервуванням викликала невелике, але вірогідне $p < 0,01$ зниження біосинтезу РНК порівняно з інтенсивністю цього процесу у клітинах, криоконсервованих без попереднього охолодження /мал.5/.

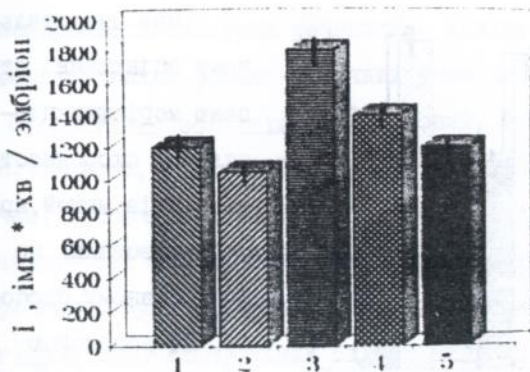
Це, очевидно, зв'язано з тим, що інгібування біосинтезу РНК при годинній адаптації ембріонів стало зупинков в розвитку постстресорної активації біосинтезу РНК, обумовленої криоконсервуванням клітин. Додаткове культивування ембріонів після деконсервування без попередньої адаптації, виявило більш активний вплив на біосинтез в них РНК, ніж холодова адаптація

/мал.5/. Це зв'язано, треба припустити, з більш швидким включенням репараційних механізмів при культивуванні, які сприяють нормалізації біосинтетичних процесів.

Ні гіпотермічний вплив /адаптація/, який передував заморожуванню ембріонів, ні культивування їх після кріоконсервування при 37°C не нормалізували повністю біосинтез РНК, хоча вірогідно і знижували його. Тому з метою нормалізації процесу біосинтезу РНК використали також сполучену дію на ембріони холодової адаптації, понадшвидкого заморожування і наступного культивування. Однак повної нормалізації біосинтезу РНК і в цьому випадку не відбулося - відрізнення з контролем залишалось вірогідним / $p < 0,05$ /. Обраховуючи це, а також для спрощення способу понадшвидкого охолодження в наступному ми виключили етап адаптації при +4°C і використали після кріоконсервування культивування.

При вивченні біосинтезу білка в ембріонах відмічалось вірогідне, порівняно з контролем, зниження включення ³H-лейцину в ембріони через I годину їх інкубації при ±4°C /мал.6/, що характерно і для біосинтезу РНК в цих умовах /мал.5/, а також властиво ряду клітин другого виду /А.О.Щуцаєва, Ю.В.Мікулінський, 1986/.

Кріоконсервування ембріонів без попередньої холодової адаптації викликало вірогідне / $p < 0,05$ / підвищення біосинтезу білка порівняно з контролем /на 50%/. Причому цей процес виявився декілька менш інтенсивним, ніж у випадку біосинтезу РНК. Це, імовірно, зв'язано з необхідністю в декілька меншій мірі, у випадку біосинтезу білка, включення компенсаторних механізмів, направлених на нормалізацію функції ембріонів. Застосування холодової адаптації перед понадшвидким заморожуванням ембріонів сприяє зниженню інтенсивності біосинтезу білка в них



Мал.6. Активність включення ^3H -лейцину в ембріони до і після криоконсервування: 1 - нативні ембріони; 2 - після холодової адаптації; 3 - після криоконсервування; 4 - після криоконсервування з попередньою холодовою адаптацією; 5 - культивування ембріонів після розморожування.

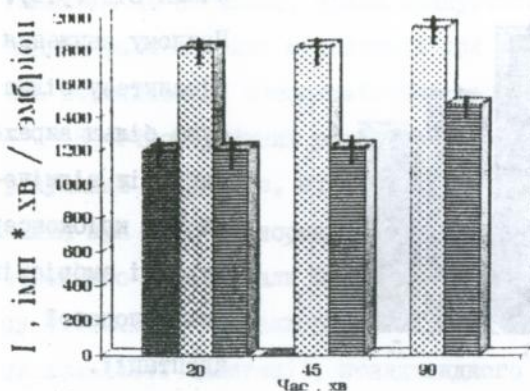
зування сприяло повному відновленню швидкості біосинтезу білка в них /мал.6/.

Однак ефективність цього процесу має свої обмеження. Так, коли ембріони криоконсервувались після 20-40-хвилинної еквілібрації в середовищі криоконсерванту при $+22^{\circ}\text{C}$, то наступне після розморожування, культивування знижало зрізний рівень білка до контрольного значення /мал.7/. Разом з тим культивування розморожених ембріонів, криоконсервування яких передувала 90 хв еквілібрація у криоконсерванті при тих же температурних умовах, не викликало вірогідного, порівняно з контролем, зниження біосинтезу білка.

Застосування після деконсервації ембріонів короткочасного культивування дозволяє відновити до нормального рівня біосинтезу білка, що сприяло успішній ембріотрансплантації і посттрансплантаційному періоду.

Після відігріву. Причому зниження біосинтезу білка було більш вираженим, ніж відмічено при криоконсервуванні ембріонів без холодової адаптації.

Встановлено, що культивування криоконсервованих без попередньої адаптації ембріонів після розморо-



Мал.7. Вплив тривалості еквілібрації на біосинтез білка в ембріонах:

1 - після кріоконсервування; 2 - додаткове культивування після кріоконсервування; 3 - нативні ембріони.

При інтегральному оцінюванні ступеня морфофункціональної схоронності ембріонів мишей, кріоконсервованих по розробленому способу, за допомогою трансплантації після розморожування самицям-реципієнтам, здійснених нехірургічним і хірургічним шляхом, вста-

новлено, що по кількості клітин, які прижилися у репродуктивних шляхах тварин, термінам наступу і розвитку вагітності і кількості помету не спостерігалось відмін від значень аналогічних показників при трансплантації нативних клітин.

Була вивчена ефективність кріоконсервування сперміїв в залежності від значень понадшвидкого охолодження і компонентів складу кріоконсерванту в умовах багатофакторного експерименту. Сперму людини еквілібрували у кріоконсерванті, з утриманням у ньому кріопротектора у концентрації менш 0,5 М, в алюмінієвих контейнерах у об'ємі 0,5 мл і заморожували з швидкостями від 3000 К/хв до 9000 К/хв. Установлено, що максимальна кількість рухомих сперміїв була в зразках, заморожених з швидкістю 3000-5000 К/хв, їх виживаємість становила 89,21%. При цьому найбільш високий процент схоронності сперматозоїдів був у тому випадку, коли у склад кріоконсерванту була введена

мембраностабілізуюча речовина - холіна-хлорид. Ураховуючи великий вплив фізико-хімічних умов середовища на скоронність біологічних об'єктів /В.Й.Дуговий, Л.А.Ханіна, С.В.Кошій, В.Чеканова, 1992, 1994/, у наступній серії експериментів вивчені кріозахисні властивості ряду алкілзаміщених гліцеринів ^{що до сперміїв} в залежності від значень гідрофільно-ліпофільного балансу цих речовин. Було встановлено, що кріозахисні властивості I-ММЕГ, гідрофільно-ліпофільний баланс яких знижений у бік гідрофобності на I, I7, порівняно з гліцерином, були аналогічні гліцерину. Подальше падіння гідрофільності і зростання гідрофобності у молекулі I-ММЕГ порівняно з цим показником для I-ММЕГ, на 0,62 викликав вірогідне падіння кріопротекторної активності у етильного заміщеного гліцерину. При цьому різниця у кріозахисній ефективності склала 20,5%. Зміщення гідрофобно-ліпофільного балансу у бік гідрофобності у I,3-ДМЕГ порівняно з I-ММЕГ на 0,53 привело до подальшого зниження скоронності сперміїв після їх кріоконсервування при понадшвидкому охолодженні /табл.1/.

Встановлено, що коли понадшвидке охолодження сперміїв здійснювали у середовищі, яке вміщує гліцерин або його метильне похідне, скоронність акросомального апарату, вміст акрозину в сперміях не змінилось. Коли у склад кріоконсерванту в якості кріопротектора включали I-ММЕГ, вміст акрозину і скоронність акросоми вірогідно знижувалась / $p < 0,05$ / порівняно з контролем /табл.1, табл.2/.

Проведені нами дослідження дозволяють гадати, що ступінь морфологічних, візуально видимих пошкоджень сперміїв, не відповідає глибині функціональних порушень в них. Як свідчить з одержаних даних, 15,7%-ному зниженню вмісту акрозину у сперміях, які перенесли кріоконсервування в середовищі

Таблиця I

Активність акрозину /ум.од/10⁹ клітин/ у сперміях до і після
кріоконсервування

Вид кріопротекторів	Концентрація клітин до і після кріоконсервування, млн/мл	Вживасмість %	Активність ферменту		Вірогідність		Схоронність активності акрозину	
			до кріоконсервування	після кріоконсервування	по відношенню до контролю	по відношенню до гліцерину	по відношенню до контролю	по відношенню до гліцерину
1. Контроль (Сперма з кріоконсервантом без кріопротектора)	81,5±244	-	2,35±0,22				100%	
2. Гліцерин	80,7±3,1 P _I 0,05	90,0±4,5	2,41±0,10	2,31±0,11	> 0,05		98,3	100%
							P ₃ > 0,05	
3. Монометилловий ефір гліцерину	78,1±3,4 P _I > 0,05	88,0±2,5 P ₂ > 0,05	2,36±0,28	2,32±0,2	> 0,05	> 0,05	98,7	96,3
							P ₃ > 0,05	P ₄ > 0,05
4. Моноетилловий ефір гліцерину	77,3±3,4 P _I > 0,05	60,0±3,4 P ₂ < 0,05	2,33±0,21	1,98±0,20	< 0,05	< 0,05	84,3	82,2
							P ₃ < 0,05	P ₄ < 0,05

P_I, P₃, P₄ - вірогідність відрізень по відношенню до контролю

P₂ - вірогідність відрізень по відношенню до гліцерину.

Таблиця 2

Схоронність акросоми у сперміях після кріоконсервування з понадшвидким охолодженням

Вид кріопротектора	Кількість, млн/мл	Вживаемість, %	Стан акросоми			Схоронність акросоми / порівняно з контролем / непошкоджені
			непошкоджені	які руйнуються	зруйновані	
1. Контроль (Сперма з кріоконсервантом без кріопротектора)	78,2±3,4		63,8±3,2	19,7±2,3	16,5±1,6	100%
2. Гліцерин	78,2±3,4 P ₁ > 0,05	90,5±2,3	58,9±3,1 P ₃ > 0,05	23,3±1,8 P ₃ > 0,05	17,8±0,63 P ₃ > 0,05	90,9% P ₄ > 0,05
3. Монометилловий ефір гліцерину	79,1±4,1 P ₁ > 0,05	88,3±3,1 P ₂ > 0,05	57,4±4,2 P ₃ > 0,05	24,4±2,9 P ₃ > 0,05	18,2±0,57 P ₃ > 0,05	88,5% P ₄ > 0,05
4. Моноетилловий ефір гліцерину	72,8±3,9 P ₁ < 0,05	58,7±3,0 P ₂ < 0,05	44,8±3,0 P ₃ < 0,05	36,9±1,4 P ₃ < 0,05	18,3±0,49 P ₃ > 0,05	69,0% P ₄ < 0,05

P₁, P₃, P₄ - вірогідність відрізень по відношенню до контролю

P₂ - вірогідність відрізень по відношенню до гліцерину.

I-МЕЕГ, відповідає 30,0%-ве падіння виживаємості і збільшення кількості акросом, які руйнуються /табл.1/, /табл.2/. Вивчений нами біохімічний показник функціональної активності сперміїв акрозин, також як і показник схоронності акросоми - залежить від складу середовища, в якому здійснюється понадшвидке охолодження гамет.

Кріоконсервування сперміїв в умовах понадшвидкого охолодження при включенні в кріоконсервант гліцерину і монометилового його ефіру дозволило зберегти активність цитозольної Г6ФДГ на рівні, відповідному інтактним клітинам. Включення до складу вказаного кріоконсерванту гліцерину сприяло схоронності активності фермента, що обумовлено підвищеною його стійкістю у складі гамет, високою схоронністю їх мембрани, виключаючої елімінацію каталітичного білка в позаклітинне середовище. Це, треба думати, зв'язано як з позитивним впливом на схоронність активності ферменту нековалентної імібілізації компонентами кріоконсерванту, так і з компартименталізацією каталітичного білка в цитозолі сперміїв, що згоджується з загальною концепцією стабілізуючого впливу мікрооточення на стійкість ферментативних білків до дії екстремальних факторів, сформульованої В.Й.Луговим /1986/.

Включення в середовище заморожування сперміїв I-МЕЕГ привело до вірогідного / $p < 0,05$ / падіння в них на 27,1% активності Г6ФДГ, порівняно з контролем, в якості якого служив рівень активності цього ферменту в гаметах, кріоконсервованих під захистом гліцерину.

Проведені дослідження дозволили відзначити, що оцінка схоронності ферменту в клітинах і екзоцелюлярному середовищі не може бути однозначною і повинна проводитись з урахуванням можливостей інактивації каталітичного білка під впливом понад-

швидкого охолодження і середовища заморожування, як це було переконливо показано на прикладі включення у кріоконсервант І-МЕЕТ.

В результаті комплексного вивчення дії понадшвидкого охолодження репродуктивних клітин в середовищі поліфункціональних кріоконсервантів розроблені високоефективні, прості в реалізації, добре відтворені способи кріоконсервування спермій людини і ембріонів мишей, які служать, поперед усього, класичною біологічною моделлю в проваджуваних кріобіологічних дослідженнях.

Оцінка запліднюючої активності спермій людини, кріоконсервованих розробленим способом, була проведена на базі кафедри акушерства та гінекології Харківського Державного медичного університету /висловлюю велику вдячність і подяку співпрацівникам кафедри, які активно брали участь в проведенні цих робіт, а також зав.кафедрою академіку НАН України В.І.Грищенко та директору Регіонального центру планування сім'ї і репродукції м.Харкова к.м.н. В.А.Резнікову, які брали участь у впровадженні способу/. Були отримані результати, які свідчать про те, що запліднююча здатність кріоконсервованої сперми не відрізняється від нативної. Це послужило основою для широкомасштабного впровадження кріоконсервованої сперми людини в клінічну практику лікувальних закладів України та країн СНД.

ВИСНОВКИ

І. Вперше встановлено, що кріопшкодження спермій і ембріонів в умовах понадшвидкого охолодження викликані проявом комплексу факторів, пов'язаних з розвитком ендоцелюлярної кристалізації, "ефектом розчину", пошкодженням цитоплазматичної мембрани, що відбувається внаслідок неоптимального процесу

їх дегідратації.

При переведенні багатоклітинних /стадія морули/ ембріонів у стан глибокого холодowego анабіозу за допомогою понадшвидкого охолодження /9000 К/хв/ максимально знижується негативний вплив характерних фізико-хімічних факторів, які реалізуються в процесі заморожування-відігріву і обумовлюють пошкодження ендоцелюлярних структур і мембранного апарату.

2. Вперше визначено, що криозахист репродуктивних клітин визначається сполученням оптимальних швидкостей охолодження і вмістом у середовищі криопротекторів ендоцелюлярної і змішаної дії у низькій концентрації - менше 0,5 М. Якщо відносно сперміїв ефективний криозахист відзначено при введенні до складу криоконсерванту одного криопротектора в концентрації менше 0,5 М, то для ембріонів - трьох криопротекторів у низькій концентрації і в рівному співвідношенні, що забезпечило схоронність більше 85% клітин в обох випадках.

3. Вперше проведено порівняльне вивчення ефективності використання мембраностабілізуючих речовин: карбохоліну, ацетилхоліну і холіна-хлориду. Встановлено, що криозахисний ефект підвищується при введенні в криоконсервант холіна-хлориду у концентрації від 1×10^{-5} М до 5×10^{-5} М. При цьому, можливо, відбувається його взаємодія з ліпопротеїдними комплексами мембрани за допомогою обміну зв'язаної води, що, мабуть, зменшує механічні напруги в ній, які виникають при криодії і вирівнює структурні перебудови ліпід-ліпідних і ліпід-білкових комплексів, сприяючи збереженню бар'єрних властивостей мембрани.

4. Вперше сформульовані положення концепції глибокого холодowego анабіозу гамет з використанням понадшвидкого охолодження з метою їх широкомасштабного практичного застосування.

Криозахисна дія понадшвидкого охолодження репродуктивних клітин

і ембріонів пов'язана, можливо, з оптимальним для кожного їх виду дегідратаційним ефектом. Він є необхідною передумовою попередження розвитку ендоцелюлярної, летальної для клітин кристалізації. Це обумовлено складом кріоконсерванту, зокрема як його колігативними властивостями, спрямованими на нейтралізацію "ефекту розчину", який виникає у зазначених умовах, так і мембраностабілізуючою дією компонентів кріоконсерванту, які підтримують нативні властивості мембрани в процесі дегідратації клітин.

5. Кріоконсервування ембріонів не відбивалось на вміст в них ДНК, однак стимулювало біосинтез РНК і білка. Адаптація ембріонів до низьких позитивних температур протягом години, перед консервуванням, сприяла нормалізації біосинтезу РНК та білка, рівень якого не досягав норми. Культивування розморожених ембріонів протягом години мало нормалізуючий вплив на біосинтез РНК подібно адаптації і приводило до повної нормалізації біосинтезу білка. Нормалізуючий вплив культивування на біосинтез білка обмежений 25-40 хв еквілібуванням ембріонів у кріоконсерванті при $+22^{\circ}\text{C}$. Подовження цього періоду до 90 хв не приводило в результаті культивування до вірогідного зменшення, порівняно з контролем, біосинтезу білка, збільшення якого було викликано кріодією.

Після виходу з стану глибокого холодового анабіозу ембріонів, кріоконсервованих за допомогою понадшвидкого охолодження, в них розвиваються неметальні пошкодження, які репаруються на етапах культивування *in vitro* і після імплантації.

6. Доцільно і важливо для практики з метою нормалізації процесів біосинтезу РНК та білка в розморожених ембріонах використати культивування їх після відігріву і уникати попередньої підготовки клітин до кріовпливу в умовах гіпотермії, яка

практикується в більшості застосованих засобах, але при понадшвидкому охолодженні менш ефективна, ніж культивування.

7. Після виходу із стану глибокого холодowego анабіозу ембріонів їх властивості повністю відновлюються, при цьому властивості генома не змінюються, в результаті чого після імплантації у реципієнток частота і строки настання вагітності не відрізняються від аналогічних показників при імплантації нативних ембріонів.

Спермії, кріоконсервовані в цих умовах, за своєю запліднюючою здатністю не відрізнялись від нативних гамет.

8. На моделі сперми людини показана залежність кріопротекторної активності у ряді алкілзаміщених гліцерину від значень їх гідрофільно-ліпофільного балансу. Вперше для гамет встановлено допустимий інтервал, при якому зниження ступеню гідрофільності алкілзаміщених гліцерину не знижує їх кріопротекторні властивості. Максимум кріозахисних властивостей кріопротекторів у відношенні репродуктивних клітин лежить в інтервалі гідрофільно-ліпофільного балансу кріопротекторів

$\lg P = -2,39$, властивого гліцерину до $\lg P = -1,39$, що характерно для його монометилового похідного. При цьому кріозахисні властивості вказаних сполук не мають вірогідних відмін. Подальший спад гідрофільності у ряді I-МЕЕГ і I,3-ДМЕГ приводить до зниження кріопротекторних властивостей вказаних алкілзаміщених гліцерину, пов'язаного, треба вважати, з падінням колигативних властивостей цих сполук і посиленням їх гідрофобної взаємодії з компонентами мембрани.

9. Ступінь морфологічних змін при понадшвидкому охолодженні не відповідає глибині функціональних порушень у сперміях, що не відбивається негативно на їх запліднюючих властивостях. Зокрема, показано, що 15,7%-ве зниження активності акрозину в них

після кріоконсервування в умовах понадшвидкого охолодження у середовищі I-MEEГ відповідає 30%-му падінню виживаємості сперміїв, а це свідчить про схоронність гаметами їх запліднюючих властивостей.

10. В умовах понадшвидкого охолодження сперміїв елімінація акрозину із клітин відбувається не за рахунок гамет із зруйнованою акросомою, а за рахунок сперміїв, в яких руйнуються акросомальні формування.

11. При понадшвидкому охолодженні сперміїв у середовищі гліцерину і його метильного похідного не відбувається порушення їх цитоплазматичної мембрани, що впливає з активності цитозольного ферменту Г6ФДГ. При введенні в середовище заморожування I-MEEГ відбувається зниження активності ферментативного білка в сперміях, що обумовлено елімінацією його з клітин в зовнішнє середовище через порушення цілісності їх мембрани, а також частковою інактивацією Г6ФДГ. Це обумовлено втратою кріопротектором колигативних властивостей, що може привести за рахунок "ефекту розчину" до інактивації білка.

12. Вивчення особливостей механізму кріоповшкодження і кріозахисту ембріонів, ^{які} є спільною біологічною моделлю для проведення подібного роду досліджень, дозволили виявити загальні закономірності вказаних процесів, що в наступному може бути використане при розробці способів кріоконсервування ембріонів людини з метою клінічного застосування.

13. Розроблений ефективний оригінальний технологічний процес кріоконсервування сперми людини з використанням понадшвидкого охолодження, що дозволило запропонувати спосіб її кріоконсервування, який за своєю ефективністю і простотою реалізації не має аналогів у світовій науці та практиці, запатентований у нашій країні і за кордоном. Це дало можливість здійснити широко-

масштабне впровадження нового способу криоконсервування сперми людини у лікувальний процес і розв'язати проблему забезпечення клінічної медицини цінним генетичним біоматеріалом у тих масштабах, які вона потребує на сучасному рівні розвитку. /Патенти США, Великої Британії, Японії, Франції, Росії/.

Перелік робіт, опублікованих за темою
дисертації

1. Сверхбыстрые скорости охлаждения и витрифицирующие растворы в криобиологии // Пробл. криобиологии. - 1993. - № 3. - С.3-13 /соавт. Грищенко В.И., Калугин Ю.В.
2. Некоторые аспекты криоконсервации эмбрионов и спермы // Пробл. криобиологии. - 1994. - № 2. - С.29-37 /соавт. Грищенко В.И., Калугин Ю.В.
3. Оценка сохранности акросомы спермиев человека после криоконсервирования со сверхвысокими скоростями охлаждения с целью их клинического использования // Вестник проблем биологии и медицины. - 1997. - вып.7. - С.73-79.
4. Сохранность акрозина в спермиях человека, криоконсервированных в условиях сверхбыстрого охлаждения для клинических целей // Вестник проблем биологии и медицины. - 1997. - вып.7. - С.80-86.
5. Изучение зависимости между интегральной сохранностью спермиев человека при их сверхбыстром охлаждении и активности в них акрозина // Вестник проблем биологии и медицины. - 1997. - вып.7. - С.87-92.
6. Новые подходы к проблеме низкотемпературного консервирования репродуктивных клеток животных и человека // Криобиология. - 1997. - № 1-2. - С.61-67 /соавт. Грищенко В.И.

7. Достижения и перспективы развития криоконсервирования эмбрионов млекопитающих // Вестник проблем биологии и медицины. - 1997. - вып.12. - С.90-99.

8. Исследование биосинтеза нуклеиновых кислот эмбрионов после их сверхбыстрого замораживания и размораживания // Вестник проблем биологии и медицины. - 1997. - вып.12. - С.100-108.

9. Влияние сверхбыстрого охлаждения эмбрионов на биосинтез белка *in vitro* после оттаивания // Вестник проблем биологии и медицины. - 1997. - вып.12. - С.108-115.

10. Биохимические свойства нативных и криоконсервированных спермиев человека // Патологические аспекты действия холода. /Сб. науч. тр./. - Харьков: ИПК и К АН Украины. - 1989. - С.32-36, /соавт. Грищенко В.И., Парашук Ю.С., Смаглый Н.Ю. и др.

11. Новый подход к реализации криозащиты эмбрионов // Криоконсервирование репродуктивных клеток и эмбрионов. /Сб. науч. тр./. - Харьков: ИПК и К АН Украины. - 1992. - С.61-65, /соавт. Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Черныш Е.Н. и др./.

12. Криоконсервация спермы в условиях сверхбыстрого охлаждения. // Криоконсервирование репродуктивных клеток и эмбрионов. /Сб. науч. тр./. - Харьков: ИПК и К АН Украины. - 1992. - С.44-48, /соавт. Калугин Ю.В.

13. Изучение некоторых аспектов сохранности морфофункциональных свойств спермиев при их сверхбыстром охлаждении // Бесплодие. Вспомогательные репродуктивные технологии. /Сб. науч. тр./. - Киев: Украинская академия национального прогресса. - 1997. - С.161-163.

14. Патент № 22I9934 Великобритания, МКИ⁴ A01N1/02.
Способ низкотемпературного консервирования спермы, /соавт.
Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Парашук Ю.С. и др. // опубл.
28.12.1989.
15. Патент № 2220054 Великобритания, МКИ⁴ 5/00;
F 25B 19/00. Устройство для охлаждения и замораживания
биологических объектов. /соавт. Грищенко В.И., Тарасов В.Ф.,
Гальченко С.Е. и др. // опубл. 28.12.1989.
16. Патент № 22I9923 Великобритания, МКИ⁴ A01N1/02.
Способ низкотемпературного консервирования эмбрионов.
/соавт. Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Черныш Е.Н.
// опубл. 28.12.1989.
17. Патент № 38226I7, ФРГ, МКИ⁴ A61K 35/I2; C12 N
5/00; C09K 5/00. Способ низкотемпературного консервиро-
вания спермы. /соавт. Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Пара-
шук Ю.С. и др. // опубл. 18.01.1990.
18. Патент № 3822589, ФРГ, МКИ⁴ A61K 35/I2; C12 N
5/00; C09K 5/00; F 25 3/I0. Устройство для охлаждения
и замораживания биологических объектов. /соавт. Грищенко В.И.,
Тарасов В.Ф., Гальченко С.Е. и др. // опубл. 8.01.1990.
19. Патент № 3822586 ФРГ, МКИ⁴ A01N1/02; A61K 35/I2;
C12N 5/00; C02K 5/00. Способ низкотемпературного консерви-
рования эмбрионов. /соавт. Грищенко В.И., Калугин Ю.В.,
Черныш Е.Н. // опубл. 18.01.1990.
20. Патент № 4965I86 США, МКИ A01N1/02. Способ низко-
температурного консервирования спермы. /соавт. Грищенко В.И.,
Калугин Ю.В., Парашук Ю.С. и др. // опубл. 23.10.1990.

21. Патент № 4817397 США, МКИ Г 25В 19/00. Устройство для охлаждения и замораживания биологических объектов. /соавт. Грищенко В.И., Тарасов В.Ф., Гальченко С.Е. и др. // опубл. 04.04.1990.

22. Патент № 4965185 США, МКИ А01N 1/02. Способ низкотемпературного консервирования эмбрионов. /соавт. Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Черныш Е.Н. // опубл. 23.10.1990.

23. Заявка № 2632820 Франция, МКИ А01N 1/02. Способ низкотемпературного консервирования спермы. /соавт. Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Парашук Ю.С. и др. // опубл. 16.11.1990.

24. Заявка № 2632821 Франция, МКИ А01N 1/02. Способ сохранения зародышей при низкой температуре. /соавт. Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Черныш Е.Н. // опубл. 16.11.1990.

25. Заявка № 2633036 Франция, МКИ F 25В 3/10. Устройство для охлаждения и замораживания биологических объектов. /соавт. Грищенко В.И., Тарасов В.Ф., Гальченко С.В. и др. // опубл. 16.11.1990.

26. Патент № 1655426 РФ, МКИ А01N 1/00. Устройство для замораживания биологических объектов. /соавт. Грищенко В.И., Тарасов В.Ф., Гальченко С.Е. и др. // опубл. 15.06.1991.

27. Патент № 1660651 РФ, МКИ А01N 1/00; А61В 17/36. Способ консервирования спермы человека. /соавт. Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Парашук Ю.С. и др. // опубл. 07.07.1991.

28. Патент № 1683621 РФ, МКИ А01N 1/0. Способ низкотемпературного консервирования эмбрионов. /соавт. Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Черныш Е.Н. // опубл. 15.10.1991.

29. Патент № I735424 Япония, МКИ⁴ A01N1/02. Способ низкотемпературного консервирования эмбрионов. /соавт. Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Черныш Е.Н. // опубл. 07.04.1993.

30. Патент № I82III8 РФ, МКИ⁴ A01N1/02. Способ консервирования эмбрионов млекопитающих. /соавт. Грищенко В.И., Загнойко В.И., Колаева С.Г., Комарова Л.И. // опубл. 15.06.1993.

31. Патент № 3089 Украина, МКИ⁴ A01N1/02. Засіб криоконсервування ембріонів ссавців. /соавт. Грищенко В.І., Загнойко В.І., Коласва С.Г., Комарова Л.І. // опубл. 12.10.1993.

32. Особенности криозащиты спермы человека в условиях сверхбыстрого замораживания. // I З'їзд українського товариства кріобіології і кріомедицини: Тези доповідей. Харків, 18-20 жовтня 1995 р. - Харків: Б.И., 1995. - С.150-152.

33. Исследование криозащитной эффективности сверхбыстрого охлаждения в отношении цитоплазматической мембраны эмбрионов. // I З'їзд українського товариства кріобіології і кріомедицини: Тези доповідей. Харків, 18-20 жовтня 1995 р. - Харків: И., 1995. - С.90-92 /соавт. Грищенко В.І., Калугин Ю.В.

34. A new approach to realizing cryoprotection of embryos.// CRYO 1991: 28th Annual Meeting, Society for Cryobiology: Proceeding; 7-12 July 1991: - Belgium - p.38. /co-author: Grischenko V.I., Kalugin Y. V./

35. Superspeed Freezing to sperm cryopreservation.// 7th Symposium uber Problem der Tieftemperaturkonservierung von Zellen, Gelveben und Organen. - Berlin, 1991. - P. 18 /co-authors Grischenko V.I., Kalugin Y.V./

36. A new approach to realizing cryoprotection of embryos//
Cryobiology. - 1991. 28, № 6. - P. 536 /co-authors
Grischenko V.I., Kalugin Y.V. /
37. A new approach to realization of sperm and embryo
cryoprotection. // Current Progress in Cryobiology,
II Intern. Conf.: Proceeding; 21-25 April 1992. -
Kharkov, 1992. -P. 68/co-authors Grischenko V.I /
38. Study of cryoprotective activity of series of alkyl
and ethoxyl derivatives of polyols and amides using
human spermia.//Current Progress in Cryobiology,II
Intern.Conf.: Proceeding.,21-25 April 1992.-Kharkov,
1992.- P. 82/co-authors Kalugin Y.V.,Chernysh E.N.,
Koschily S.V., Chekanova V.V./
39. The effect of cryopreservation factors on some
morphological and genetical characteristics of mouse
embryos //International Meeting, University of Leuven,
The Society for Low Temperature Biology: Proceeding.,
19-23July,1994.-Belgium.-1994.-P. 5 /co-authors Gris-
henko V.I., Petrushko M.P., Kalugin Y.V. /
40. Study of ultrarapid cooling effect on biosynthesis of
nucleic acids and proteins in embryos.//Cryo 1997:
34 Annual Meeting, Society for Cryobiology: Proceeding
8-12 June 1997.- Spain P. 40 /co-authors Grishenko V

Лучко Н.А. "Влияние условий сверхбыстрого охлаждения на морфофункциональные свойства спермиев и эмбрионов". Рукопись. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.22 - криобиология. Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии наук Украины. Харьков, 1997 г.

Впервые установлено, что при переводе спермиев человека и эмбрионов мышей в состояние глубокого холодового анабиоза с помощью сверхвысоких скоростей охлаждения и применения многокомпонентных криоконсервантов с низким содержанием веществ, одним из которых является мембраностропное соединение из группы холинов максимально снижается отрицательное влияние физико-химических факторов криоконсервирования, что позволяет добиться высокого содержания жизнеспособных клеток с сохранением исходных свойств. Впервые показано, что в зависимости от вида биологических объектов максимальная их сохранность при замораживании достигается с оптимальными значениями сверхбыстрых скоростей охлаждения для данных объектов: для спермиев - 3000-5000 К/мин, для эмбрионов - 9000 К/мин. Изучен характер влияния оптимальных условий ввода /и вывода/ репродуктивных клеток и эмбрионов в состояние глубокого холодового анабиоза в условиях сверхбыстрого охлаждения на свойства их мембран, а также на уровень биосинтеза белка, ДНК, РНК - для эмбрионов и активности акрозина и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы - для спермиев человека. Установлено, что при снижении значений гидрофильно-липофильного баланса алкилзамещенных глицерина резко снижается их криопротекторная активность в отношении репродуктивных клеток. Разработаны оригинальные способы криоконсервирования спермы и эмбрионов по своей эффективности и простоте реализации, не имеющие аналогов в мировой науке и практике, запатентованные за рубежом.

Luchko N.A. "THE EFFECT OF ULTRARAPID COOLING CONDITIONS ON MORPHOFUNCTIONAL PROPERTIES OF SPERM AND EMBRYOS". Manuscript. Thesis for obtaining scientific degree of doctor of biological sciences on the speciality 03.00.22 - cryobiology. Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov, 1997.

For the first time it has been established that when transferring human spermatozoa and mouse embryos in the state of deep cooling anabiosis by means of ultrarapid cooling rates and application of multicomponent cryopreservatives with low content of substances, one of which is membranotropic compound of choline group, maximally decreases negative influence of physical and chemical cryopreservation factors, that allows to obtain a high content of viable cells with preservation of initial properties. For the first time it has been shown, that depending on the type of biological object their maximum preservation is achieved by freezing with optimal values of ultrarapid cooling rates for given objects: for sperm - 3000-5000 K/min, for embryos - 9000 K/min. The effect character of optimal conditions of introduction/ and taking out of reproductive cells into the state of deep cold anabiosis under conditions of their ultrarapid cooling on their membranes properties as well as level of biosynthesis of protein, DNA, RNA, - for embryos and activity of acrosin and glucoso-6-phosphatodehydrogenase. It has been established that during the decrease in the values of hydrophilic - lipophilic balance of alcyI-substituted glycerol their cryoprotective activity regarding reproductive cells sharply decreases. Original ways for cryopreservation of sperm and embryos on their efficiency and simplicity of realization, having no analogous in the world science and practice, patented abroad, have been developed.

Ключові слова: сперма, ембріони, понадшвидке охолодження, кріоконсервування, акрозин, глікозо-6-фосфатдегідрогеназа, акросома, кріоконсервант, гідрофільно-ліпофільний баланс, кріопротектори, виживаемість, ДНК, РНК, білок, флуоресцентні зонди, культивування, трансплантація, інсемінація.

Handwritten text at the top of the page, possibly a title or reference number.

Handwritten text in the lower section, possibly a date or reference number.

Handwritten text in the lower section, possibly a name or address.

AB 38.364

Будова системи споряд.
Кріслооборудування, верстати,
верстати, кріслооборудування, гідрофізико-аеродинамічні системи.
Діагностика, нормалізація. ІК, РІК, біологія, фізична культура.
Будова, кріслооборудування, транспортні засоби, будівництво.

Підписано до друку 24.12.96 р. Формат 15x101/2

Умовн. друк. ліст 2,0.
Тираж 100 прим. Замовл. №238
ООО "АЛЬФА" 430-721