



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **70150** (13) **U**  
(51) МПК  
**A01N 1/02** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<p>(21) Номер заявки: <b>u 2011 14107</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>29.11.2011</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.05.2012</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.05.2012, Бюл.№ 10</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Андрейченко Сергій Вадимович (UA), Кондратова Юлія Анатоліївна (UA), Клепко Алла Володимирівна (UA), Нурищенко Наталія Євгенівна (UA), Чернишов Андрій Вікторович (UA), Булавицька Вероніка Михайлівна (UA)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "НАУКОВИЙ ЦЕНТР РАДІАЦІЙНОЇ МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ", вул. Мельникова, 53, м. Київ-50, 04050 (UA)</b></p>
--	---

**(54) СПОСІБ ДОВГОТРИВАЛОГО ЗБЕРІГАННЯ СПЕРМИ ЛЮДИНИ В ЛАБОРАТОРНИХ УМОВАХ**

**(57) Реферат:**

Спосіб довготривалого зберігання сперми людини в лабораторних умовах включає розведення сперми людини розчином ТЕСТ буферу з рН=7,35 у комбінації з 20 % жовтком та 8 % глюкозою у співвідношенні 1:1. До суміші додатково вноситься гліцерол в концентрації 6,5 % після чого новоутворена суміш спочатку заморожується до -5 °С, а потім до -193 °С.

**U**  
**UA 70150**  
**U**



Корисна модель належить до галузі медицини, зокрема до репродуктивних біотехнологій, і може бути використана у науково-дослідних установах, де вивчають фізіолого-біохімічні особливості сперматозоїдів людини, а також у андрологічних лабораторіях при проведенні серійних аналізів з діагностики фертилізаційного потенціалу сперми.

5 Відомі способи кріоконсервації сперми людини при низьких температурах з використанням кріоконсерванту гліцеролу, а також антиосмотичних речовин таких, як глюкоза, фруктоза або цитрат натрію [1, 2]. Недоліком цих способів є те, що за їх протоколом не вдається в значній мірі уникнути утворення великих кристалів льоду та солі в цитоплазмі сперматозоїда, що згодом при розморожуванні сперми у багатьох випадках призводить до руйнування суцільної структури

10 поверхневих мембран сперматозоїдів, а також до суттєвого погіршення рухливості та втрати життєздатності сперматозоїдами.

Вказаний недолік частково вдається подолати застосуванням способів кріоконсервації сперми у спеціальних автоматизованих системах контролю за зниженням та зростанням температури в біологічному матеріалі [3, 4]. Однак такі автоматизовані системи з технічної точки зору є достатньо складними і, відповідно, досить недешевими в експлуатації, що обмежує їх практичне використання. Крім того, температурні діапазони контрольованої кріоконсервації в цих приладах обмежені.

Прототипом способу, що заявляється, слід вважати спосіб короткотривалого кріозберігання сперми людини при 5 °С у середовищі, що складається з ТЕСТ буферу (85 мМ тригідроксиметиламінометану та 189 мМ п-тригідроксиметил-метил 1,2-аміноетансульфонової кислоти у фізіологічному розчині) з додаванням 20 % яєчного жовтку [5]. Недоліком даного способу є те, що він дозволяє зберігати сперму лише протягом декількох днів без погіршення її кінетичних та морфологічних характеристик. Тому довготривале зберігання сперми за цим методом неможливе. Задачею корисної моделі є оптимізація компонентного складу поживного середовища для її збереження протягом кріоконсервації в лабораторних умовах з тим, щоб досягти найменшої втрати сперматозоїдами їх кінетичних властивостей і життєздатності у процесі заморожування-розморожування сперми в лабораторних умовах.

20 Заявлений нами спосіб довготривалого зберігання сперми людини усуває недолік прототипу і забезпечує довготривале зберігання сперми людини протягом дванадцяти місяців з майже незмінними морфо-функціональними характеристиками, оскільки розбіжності у показниках не перевищують 10 % порівняно із щойно зібраною спермою.

При розробці корисної моделі поставлену задачу було вирішено шляхом оптимізації складу кріоконсервуючого середовища завдяки внесення 6,5 гліцеролу та 8 % глюкози до ТЕСТ буферу з рН 7,35, що містить 20 % яєчного жовтку, а також застосуванням двостадійного процесу заморожування сперми, яке передбачало початкове охолодження до -5 °С з наступним швидким перенесенням зразків у пластикових пробірках до рідкого азоту. Після кріозберігання сперму швидко розморожували при 37 °С в термостаті протягом 20 хв.

Ефективність запропонованого способу продемонстровано наступними прикладами.

Приклад 1.

40 Збір сперми проводили шляхом мастурбації після 4 днів статевого утримання від 16 чоловіків-нормодонорів, що були, за їх власною згодою, задіяні у дослідженні. Кожний зразок сперми поділявся на 2 частини. Першу частину використовували для негайного визначення рухливості та життєздатності сперматозоїдів, для чого сперму спочатку розріджували у термостаті при 37 °С 45 хв., а потім добре перемішували. Краплину суміші за допомогою скляної палички переносили на предметне скло та накривали покривним скельцем.

45 Підготовлений препарат використовували зразу ж для підрахунку загальної рухливості сперматозоїдів на збільшенні x400 під мікроскопом "МБИ-6" (Росія). Для кожного препарату підраховували 200 навмання відібраних сперматозоїдів у 4 різних полях зору. Визначення життєздатності проводили за допомогою вітального фарбування сперматозоїдів сумішшю 10 % нігрозину та 1 % еозину (10:1) у фізіологічному розчині.

50 Життєздатні сперматозоїди залишались не пофарбованими, оскільки були непроникними для барвника. В той же час у мертвих сперматозоїдів відбувалось накопичення барвника в цитоплазмі, тому вони мали рожеве або червоне забарвлення.

Другу частину кожного еякуляту нормальної за критерієм ВООЗ сперми направляли на заморожування та кріозберігання.

55 Сперму заморожували наступним чином. Спочатку до кожного зразка додавали кріоконсервуюче середовище, добре перемішували скляною паличкою і переносили у поліетиленову пробірку з кришечкою, а потім пробірку зі спермою ставили у охолоджувач з температурою -5 °С. Еквілібрацію проводили протягом 3-х годин. Після чого зразки сперми занурювали у рідкий азот, що зберігався у дьюарі.

60

Випробовували 4 варіанти кріоконсервуючого середовища. У варіанті 1 до сперми додавали гліцерол до кінцевої концентрації 6,5 %. У варіанті 2 сперму розводили розчином ТЕСТ, що містив яєчний жовток у концентрації 20 % у співвідношенні 1:1. У варіанті 3 до сперми спочатку додавали такий же за об'ємом розчин ТЕСТ з 20 % яєчним жовтком, а потім у суміш вносили гліцерол до кінцевої концентрації 6,5 %. У варіанті 4 все робили так, як і у варіанті 3 з однією відмінністю, оскільки у поживне середовище ТЕСТ-яєчний жовток додатково вносили глюкозу у концентрації 8 %. Після дванадцятимісячного кріозберігання сперми у рідкому азоті, сперму розморожували шляхом витримування при кімнатній температурі протягом 20 хвилин з наступним розрідженням у термостаті при 37 °С протягом 45 хв. У розмороженій спермі мікроскопічно вивчали рухливість та життєздатність сперматозоїдів порівняно із свіжою спермою.

Результати дослідження представлені у табл. 1.

Як бачимо найкращі результати було отримані у варіанті 4, де відмінності з контролем (варіант 5) були незначними і не мали статистично достовірної значущості. У всіх інших варіантах (1, 2, 3) показники рухливості і життєздатності сперматозоїдів суттєво відрізнялись від контрольних величин ( $p < 0,05$ ). У варіанті 2 використовували кріоконсервуюче середовище, що було запропоновано у прототипі, без будь-яких додаткових модифікацій. В цьому випадку результати кріозберігання у рідкому азоті (-193 °С) виявились найгіршими.

Таким чином, встановлено, що оптимальним за своїм складом для проведення кріозберігання сперми людини в рідкому азоті є кріоконсервуюче середовище, що складається з 6,5 % гліцеролу, 8 % глюкози, 20 % яєчного жовтку і ТЕСТ буферу з  $pH=7,35$ . В цій системі гліцерол виконує функцію кріоконсерванта, глюкоза - антиосмотика, яєчний жовток перешкоджає окисненню сульфгідрильних груп мембранних ліпідів на поверхні сперматозоїда, а ТЕСТ буфер покращує морфо-кінетичні характеристики сперми після кріоконсервування. Тому поєднана дія всіх цих речовин у кріоконсервуючій суміші і зумовлює найліпший кріопротекторний ефект на сперматозоїди за умов заморожування-розморожування у поєднанні з тривалим кріозберіганням.

Приклад 2.

Нормальну за критеріями ВООЗ сперму отримували від донорів-добровольців за їх власною згодою. Сперма у процесі мастурбації збиралась у стерильні пластикові контейнери. Зразу після збору кожний зразок сперми поділяли на 2 частини, з них першу використовували для визначення морфо-фізіологічних характеристик сперматозоїдів, після 30 хвилинного розжиження сперми в термостаті при 37 °С. Другу частину кожного еякуляту спочатку розводили рівним за об'ємом ТЕСТ буфером з  $pH=7,35$ , що містив 20 % яєчного жовтку і 8 % глюкози. Після ретельного перемішування скляною паличкою до суспензії додавали гліцерол до кінцевої концентрації 6,5 % і проводили гомогенізацію суміші протягом 15 хв. за допомогою "Vortex".

Заморожування сперми проводили відповідно до наступних 4-ох протоколів.

1. Поступове зниження температури до 0 (2 год.), а потім швидко заморожування в парах рідкого азоту при -80 °С (1 год.) з наступним переносом у рідкий азот.

2. Поступове зниження температури до +10, 0°, -10°, -20°, -80°, -193°.

3. Початкове зниження температури до -10° протягом 3 годин з наступним швидким охолодженням в парах рідкого азоту протягом 2 год. та переносом у рідкий азот.

4. Охолодження до -5 °С, а потім швидко заморожування в рідкому азоті.

Кріозберігання зразків сперми тривало 12 місяців. Після цього сперму швидко розморожували при 37 °С 20 хвилин, а потім розріджували ще 30 хвилин при 37 °С. Для визначення рухливості сперматозоїдів, краплину сперми скляною паличкою переносили на предметне скло і накривали покривним скельцем. Під мікроскопом "МБИ-6" (Росія) на збільшенні  $\times 400$  навмання відбирали 200 сперматозоїдів визначали рухливість сперматозоїдів у відсотках від загального числа сперматозоїдів, що були протестовані. Життєздатність сперматозоїдів у зразках сперми вивчали за допомогою вітального забарвлення 1 % еозин-10 % нігрозином у фізіологічному розчині. Мертвими вважали сперматозоїди, що були пофарбовані у рожевий або червоний колір. Тестування морфологічних дефектів сперматозоїдів проводили на мазках сперми після фіксації холодним 95° етанолом і фарбування гематоксиліном по Папаніколау [6].

В таблиці 2 представлені результати морфо-фізіологічного аналізу сперматозоїдів людини після їх заморожування і тривалого зберігання в рідкому азоті за 4-ма наведеними протоколами. Для порівняння в таблиці 2 також наведені морфо-фізіологічні характеристики свіжої сперми.

Як виявилось, велике значення для відновлення природних властивостей сперми має режим заморозки. Так, найкращих показників щодо рухливості, життєздатності та відсутності морфологічної патології було досягнуто за протоколом режиму 4.

Порівняно з контролем, коли проводили тестування свіжої сперми після її розрідження, у кріоконсервованих сперматозоїдах відбувалось відновлення рухливості майже на 90 %, причому руйнування самих сперматозоїдів спостерігалось лише у 14 %. Метод 2 також дав непогані результати, оскільки відновлення рухливості перевищувало 50 % і досягало 57 %. Однак, збільшення суперспіралізованих хвостів та зруйнованих акросом вказувало на можливу появу осмотичного дисбалансу в процесі розморожування. Метод 3 виявився найгіршим з усіх апробованих методів.

За характеристиками сперми метод 2 наближався до методу 3 як в першому, так і в другому випадках сперматозоїди після розморожування мали низьку життєздатність і малу рухливість. В препаратах відмічено багато поламаних сперматозоїдів без голови або із залишками хвостів.

Таким чином показано, що саме швидке заморожування сперми дає можливість уникнути утворення кристалів льоду в цитоплазмі сперматозоїда, оскільки при повільному заморожуванні біоб'єктів саме кристали льоду, що утворюються у чисельних центрах кристалізації своїми гострими кінцями пошкоджують мембрани клітин. До речі, в наших дослідах кріоконсервація сперми за методом 2, який ґрунтувався на поступовому зниженні температури сперми, призвела до найгірших результатів. Дещо кращі результати були отримані за методом 3, коли температуру спочатку повільно знижували до -10, а потім зразки переносили у рідкий азот. В такій ситуації дуже вірогідно, що швидке охолодження після утворення чисельних центрів кристалізації в сперматозоїдах вже не могло повністю відмінити кристалізаційні процеси в цитоплазмі сперматозоїдів, що в решті і стало причиною суттєвої втрати життєздатності сперматозоїдами після їх кріоконсервації. Високі показники життєздатності та рухливості після кріоконсервації були встановлені для методу 1, котрий базувався на двостадійному заморожуванні сперми, починаючи з 0 °С, з початку до -80 °С, а потім вже до -193 °С. Однак найкращі результати були отримані за методом 4, коли спочатку сперму охолоджували до -5 °С, щоб не допустити утворення первинних центрів кристалізації, а потім швидко переносили у рідкий азот. При такому підході вдається уникнути додаткового льодоутворення, яке може розпочатись при температурах нижчих температури транзиції гіалінізації для кріоконсерванта - гліцеролу, що становить -63 °С.

Таким чином, дослідженнями було доведено, що проведення швидкого заморожування сперми в ТЕСТ буфері з додаванням 6,5 % гліцеролу та 8 % глюкози при рН=7,35 дає змогу зберігати сперму людини протягом 12 місяців без погіршення її фізіологічних якостей. Підібрана кріоконсервантна суміш надійно захищає сперму від негативного впливу осмотичних сил в умовах швидкого розморожування зразків.

Таблиця 1

Вплив компонентного складу кріоконсерванта на рухливість та життєздатність сперми після кріозберігання протягом 12 місяців

Варіант, №	Склад кріоконсерванта	Рухливість (%)	Життєздатність (%)
1	Гліцерол	28±6	37±5
2	ТЕСТ + яєчний жовток	20±4	28±6
3	ТЕСТ + яєчний жовток + гліцерил	48±9	57±7
4	ТЕСТ + яєчний жовток + гліцерил + глюкоза	66±8	71±6
5	Кріоконсервант не додавався (свіжа сперма)	77±10	91±7

Вплив різних режимів заморожування сперми на морфо-фізіологічні характеристики сперматозоїдів після 12-и місячного зберігання в рідкому азоті

Режим заморозки	Рухливість сперматозоїдів %	Життєздатність сперматозоїдів %	Пошкоджені акросоми, %	Зруйновані сперматозоїди, %	Суперспіралізовані хвости, %
1	58±7	63±15	17±3	11±4	9±3
2	42±5	45±10	12±4	38±9	5±2
3	40±6	44±11	12±5	37±8	83±17
4	67±9	70±13	11±3	14±5	5±2
Контроль (свіжа сперма)	78±11	96±9	2±2	0	2±1

## Джерела інформації:

1. G.M. Centola, R.F. Raubertas, J.H. Mattox. Cryopreservation of human semen: comparison of cryopreservatives, sources of variability, and prediction of post-thaw survival. - Journal of Andrology.- 1992. - Vol. 13, No. 3. - P. 283-288.
2. E.J. Woods, J.D. Benson, Yu. Agca, J.K. Critser. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. - Cryobiology.-2004. - V. 48. - P. 146-156.
3. E. Creemers, M. Nijs, E. Vanheusden, W. Ombelet. Cryopreservation of human sperm: efficacy and use of a new nitrogen-free controlled rate freezer versus liquid nitrogen vapour freezing. — First Int. J.Androl.-2011. V. 43. — P. 392-397.
4. M.E. Hammadeh, C. Dehn, M. Hippach et al. Comparison between computerized slow-stage and static liquid nitrogen vapour freezing methods with respect to the deleterious effect on chromatin and morphology of spermatozoa from fertile and subfertile men. - Inter, J. Androl.-2001. - V. 24.-P. 66-72.
5. P.M. Zavos, J.R. Correa, C.L. Foster, J.B. Massey, P.N. Zarmakoupis-Zavas. Fertilization potential and qualitative characteristics of human spermatozoa after short term cryostorage at 5 °C in two different TEST-yolk buffer preparations. - Tohoku J. Exp. Med.-1998. - V.184(2). - P.143-152.
6. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5<sup>th</sup> editor. - Geneva: WHO Press, 2010.-286 p.

## ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- Спосіб довготривалого зберігання сперми людини в лабораторних умовах, що включає розведення сперми людини розчином ТЕСТ буферу з рН=7,35 у комбінації з 20 % жовтком та 8 % глюкозою у співвідношенні 1:1, який **відрізняється** тим, що до суміші додатково вноситься гліцерол в концентрації 6,5 % після чого новоутворена суміш спочатку заморожується до -5 °С, а потім до -193 °С.

Комп'ютерна верстка Д. Шеврун

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601