

# Применение проточной цитометрии для оценки жизнеспособности сперматозоидов человека

Using of flow cytometry to assess the viability of human sperm cells

V.V. Evdokimov,  
L.A. Kharlamova, D.T. Aybyatov,  
A.S. Erokhin, V.B. Turovetskiy

Objective - to examine the possibility of application of flow cytometry to characterize the state of human sperm cells (viability) and the comparison of the results with the light microscopy as a conventional method in andrology. The study used vital dyes that detect damage to the cell membranes: eosin - for light microscopy and propidium iodide - for flow cytometry.

The comparison of cytometry and light microscopy data in the study of sperm cells freshly isolated from ejaculate showed the same number of viable cells was about 35%, indicating that in these conditions, both methods are interchangeable. After incubation of the ejaculate at room temperature for 24 hours flow cytometry detected significant increase in the percentage of dead sperm cells in comparison with light microscopy - 52% and 43% respectively. Similar differences in the comparison of methods were found also after cryopreservation of sperm - cytometry revealed 69% of non-viable sperm, microscopy - 58%. Study of the effects of oxidative stress on sperm using hydrogen peroxide revealed even more significant difference in the sensitivity of the methods: according to the cytometry percentage of non-viable 86%, and microscopy showed only 48%.

Our experiments show the advantages of flow cytometry in study of the viability of sperm cells, especially in case of exposure to ejaculate, because in these conditions, the light microscopy does not adequately reflect the extent of sperm cells damage.

*В.В. Евдокимов<sup>1</sup>, Л.А. Харламова<sup>1</sup>, Д.Т. Айбятов<sup>1</sup>,  
А.С. Ерохин<sup>2</sup>, В.Б. Туровецкий<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> ФГБУ «НИИ урологии» Минздрава России

<sup>2</sup> ВНИИ племенного дела

<sup>3</sup> МГУ, биофак

**О**дним из наиболее эффективных подходов для быстрого и точного определения характеристик клеток, их органелл, состояния цитоплазматической оболочки, оценки мембранных антигенов и многих других клеточных параметров является проточная цитофлуориметрия. Данная технология базируется на современных цитохимических флуоресцентных методах исследования и отличается высокой производительностью, позволяющей оперировать большими выборками, гарантирующими статистическую достоверность результатов. Флуоресцентные красители, проникающие в клетки, также можно использовать для дифференциации живых и мертвых клеток. Одним из подобных красителей, который принято использовать для данных целей, является иодид пропидия [1-3].

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Целью работы было изучение возможности применения проточной цитометрии для оценки состояния сперматозоидов и ее сопоставление с результатами общепринятых методов,

используемых в андрологии, в частности с методом микроскопии.

Как известно, часть сперматозоидов в процессе дифференцировки подвергается апоптозу, который на ранних стадиях характеризуется активацией эндонуклеаз, расщеплением ДНК, протеолитической деградацией ядерной оболочки, а на завершающей стадии процесса наблюдается нарушение проницаемости клеточной мембраны с последующей деструкцией клетки [4-6].

Одним из критериев оценки качества эякулята, рекомендованных ВОЗ, является подсчет процента жизнеспособных сперматозоидов, точнее, тех из них, клеточная мембрана которых непроницаема для витальных красителей, в частности для эозина. Краситель, добавленный к сперматозоидам, проникает в клетки с поврежденной мембраной и окрашивает их, затем производится подсчет окрашенных клеток в общей популяции сперматозоидов с помощью световой микроскопии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании были использованы эякуляты 43 человек: 12 - здоровых

мужчин, 20 - больных с варикоцеле и 11 - с хроническим простатитом. Возраст пациентов колебался от 18 до 45 лет. Получение и исследование эякулята, а также проницаемость мембраны сперматозоидов для эозина осуществляли по рекомендациям ВОЗ 4-го издания [7]. Использовали 1%-й водный раствор эозина (ЭО) с дальнейшей оценкой процента окрашенных сперматозоидов под световым микроскопом с увеличением 400 х, а также подсчетом не менее 200 клеток.

Для исследования жизнеспособности половых клеток с помощью проточного цитометра Coulter Epics XL (USA, Florida) применяли метод, разработанный фирмой Molecular Probes, предполагающий использование двух флуорохромов: пропидия иодида (ПИ) и сибра-14 (СИ-14), испускающих свет в различных областях спектра и регистрируемых разными каналами. ПИ проникает только в клетки с поврежденной мембраной и окрашивает их ДНК (красная флуоресценция). СИ-14 способен проникать также и через неповрежденную мембрану, окрашивая нуклеиновые кислоты всех сперматозоидов (зеленая флуоресценция). При инкубации эякулята с обоими красителями жизнеспособные клетки красятся только СИ-14, а мертвые сперматозоиды с поврежденной мембраной - обоими красителями - ПИ и СИ-14.

Образец эякулята разводили солевым буфером HEPES (1:100) и последовательно окрашивали: вначале СИ-14 в концентрации 0,02 мМ с последующей инкубацией в течение 10 минут при температуре 37°C, затем вносили ПИ

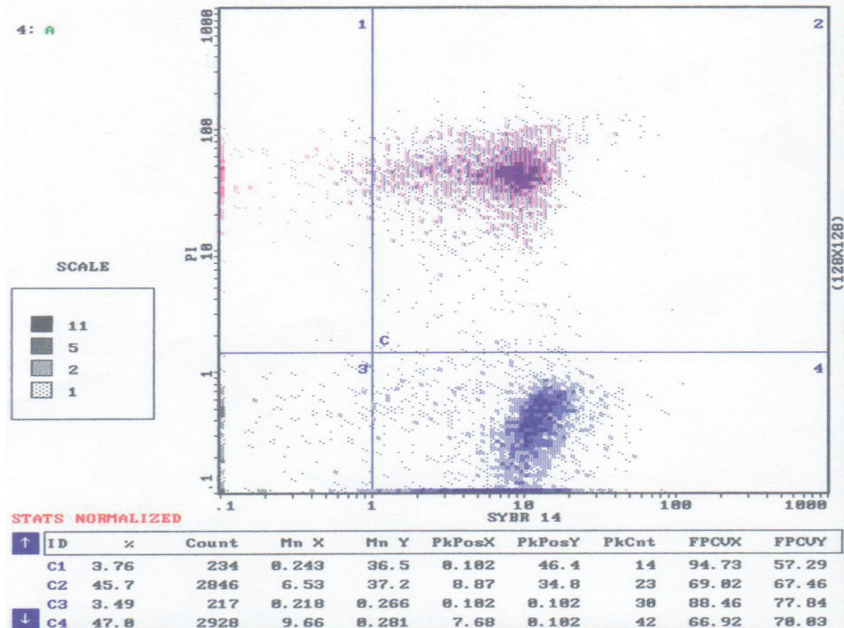


Рис.1. Двухпараметрическая гистограмма распределения сперматозоидов окрашенных сибром-14 и пробидием иодидом. Ось абсцисс - Си 14. Ось ординат - ПИ. 2-й и 4-й квадраты - это области окрашенных сперматозоидов Си 14. 2-й квадрат Си 14+ ПИ+ - мёртвые сперматозоиды; 4-й квадрат Си 14+ ПИ- - живые сперматозоиды. 1-й и 3-й квадраты - области неокрашиваемых Си 14 сперматозоидов, предположительно включает клеточный детрит.

в концентрации 2,4 мМ с дальнейшей десятиминутной инкубацией при той же температуре. Далее на проточном цитометре подсчитывали результаты каждого образца - 10 - 15 тысяч клеток. Для примера на рисунке 1 приведена гистограмма анализа эякулята пациента П.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После разжижения эякулята проводили регламентированный анализ с определением параметров подвижности, морфологии и жизнеспособности сперматозоидов.

Результаты двух методов окрашивания свежевыделенного эякулята для выявления жизнеспособности клеток (ПИ и ЭО) были близки, процент определения нежизнеспособных

сперматозоидов был равен  $35,1 \pm 11,75\%$  и  $35,6 \pm 9,5\%$  соответственно. Это позволяет рекомендовать данные методы в рутинную практику клинической андрологической лаборатории (табл. 1).

Важной проблемой андрологии и репродукции является определение жизнеспособности сперматозоидов после криоконсервации, применяемой для длительного сохранения спермы человека и животных. В связи с этим было предпринято изучение жизнеспособности сперматозоидов человека после криоконсервации вышеописанными методами. В качестве криоконсервантов применяли стерильную среду для замораживания (Sperm Freeze, Belgium), которую используют в практике вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

Методы оценки жизнеспособности сперматозоидов	% нежизнеспособных сперматозоидов (M ± m)			
	Свежевыделенный эякулят (n = 43)	Эякулят через 24 часа (N = 13)	Эякулят после криоконсервации (n = 10)	Эякулят при воздействии 1,5%-м и 3%-м раствором перекиси водорода (n = 13)
Проточная цитометрия	35,1 ± 11,7	52,4 ± 12,5	69,7 ± 4,2	86,1 ± 7,5
Световая микроскопия	35,6 ± 9,5 *	43,6 ± 7,5*	58,8 ± 10,2*	48,7 ± 9,2*
Достоверность	p = 0,64	p = 0,017	p = 0,004	p = 0,001

Замораживание/размораживание проводили по стандартной схеме. Определение живых/мертвых сперматозоидов осуществляли сразу после размораживания. Полученные результаты достоверно показывают более высокую выявляемость поврежденных клеток при обработке эякулята ПИ, уровень которых в два раза превосходил исходный. С целью изучения влияния оксидативного стресса, создаваемого в клетке активными формами кислорода (АФК), включая перекись водорода, на жизнеспособность сперматозоидов и повреждающее действие на мембрану клетки, были предприняты опыты с добавлением разных концентраций перекиси водорода (1,5% и 3%) в среду со сперматозоидами. Уровень повреждения мембраны сперматозоидов определяли обоими методами. Так как результаты воздействия двух концентраций перекиси водорода на

сперматозоиды были сопоставимы, мы объединили их в одну группу. Как следует из полученных результатов, окрашивание сперматозоидов ПИ выявляет существенно более высокий процент поврежденных клеток, а ЭО в этих случаях менее пригоден для выявления жизнеспособности сперматозоидов.

Возможной причиной расхождения результатов оценки проницаемости клеточной мембраны, окрашенной ПИ или ЭО, могло, по нашему мнению, явиться преобладание разных форм клеточной гибели: в свежее выделенном эякуляте нежизнеспособные клетки - это, в первую очередь, сперматозоиды на поздней стадии апоптоза, а криоконсервация и воздействие перекиси водорода приводит к появлению значительного количества сперматозоидов, претерпевающих некrotическую стадию гибели клетки. В этом случае, по-видимому, более

чувствительным и предпочтительным является флуоресцентный метод.

## ВЫВОДЫ

1. Проведенное исследование показало, что оба изучаемых метода оценки жизнеспособности сперматозоидов (проточная цитофлуориметрия и световая микроскопия с окраской эозином) дают аналогичные результаты и являются взаимозаменяемыми.

2. Окраске эозином недостаточно адекватно отражает уровень повреждения мембраны сперматозоидов при различных воздействиях на эякулят.

3. После определенных воздействий на эякулят *in vitro* (длительное хранение, криоконсервация, обработка перекисью водорода) цитофлуориметрический метод выявляет достоверно более высокий процент сперматозоидов с поврежденной мембраной. ■

**Ключевые слова:** проточная цитометрия, микроскопия, методы окрашивания сперматозоидов, иодид пропидия, эозин, оценка жизнеспособности сперматозоидов.

**Keywords:** flow cytometry, microscopy, staining methods of sperm, iodit propidium, eosin, assessment of sperm viability.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Абубакиров А.Н. Повреждение ДНК сперматозоидов и мужское бесплодие. // Урология - 2009. - № 3. - С. 86 - 90.
2. Долгов В.В., Луговская С.А., Фанченко Н.Д., Миронова И.И., Назарова Е.К., Ракова Н.Г., Раков С.С., Селиванов Т.О., Щелоков А.М.. Лабораторная диагностика мужского бесплодия. М., 2006. 144 с.
3. Falzone N., Huyser C., Franken D.R. Comprason between propidium iodide and 7-amino-actinomycin-D for viability assesment during flow cytometric analyses of the human sperm acrosome. // Andrologia, 2010. Vol. 42, № 1. P. 20-26. 10.
4. Комарова М.В. Характеристика эякулята в оценке репродуктивных возможностей человека: Автореф. канд. биол. наук. Уфа, 2000. 19 с.
5. Шеина Ю.И., Еремеев А.В., Зайцева Т.А. и др. Анализ фрагментации ДНК сперматозоидов у пациентов с бесплодием. // Тез. докладов XXI межд. конф. РАРЧ. СПб., 2012. - С. 134.
6. Darzynkiewicz Z., Juan G., Li X., Gorczyca W., Murakami T., Traganos F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death ( necrosis ). // Cytometry, 1997. Vol. 27, N 1. P. 1 - 20.
7. Руководство ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью. 4-е изд. М., 2001. 144 с.
8. Tarozzi N., Bizzaro D., Flamigni C., Borini A. Clinical relevance of sperm DNA damage. // Reprod Biomed, 2007. Vol. 14, N 6. P. 746 - 757.