

ТРАНСПОРТ ГЛИЦЕРИНА ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ СПЕРМАТОЗОИДА ЧЕЛОВЕКА ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

© 2024 г. А.А. Иванова^{*,#}, И.И. Леонов^{*}, Е.С. Гнилозуб-Волобуева^{*},
М.А. Овчинников^{**}, С.А. Яковенко^{*}, Е.Ю. Симоненко^{*}

^{*}Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1/2, Москва, 119991, Россия

^{**}Научно-исследовательский институт ядерной физики им. Д.В. Скобельцына Московского государственного
университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/2, Москва, 119991, Россия

[#]E-mail: Annetkurella@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.03.2024 г.

После доработки 02.04.2024 г.

Принята к публикации 17.04.2024 г.

Криоконсервация биологического материала является важной задачей многих областей биологии и медицины, особенно для вспомогательных репродуктивных технологий. Для эффективной криоконсервации клеток используются криопротекторные среды, включающие в себя проникающие в клетку и не проникающие компоненты. Часто в качестве проникающего компонента выступает глицерин в различных концентрациях. Однако выяснение механизмов криопротекторного действия этих соединений, а также повышение доли выживших клеток после криоконсервации остаются актуальными задачами криобиологии. В работе исследуется механизм переноса глицерина через мембраны сперматозоидов с участием аквапоринов методом математического моделирования. Представленная модель описывает динамику изменения объема сперматозоида в зависимости от концентрации глицерина и сахарозы в криопротекторной среде. В результате проведенного анализа рассчитано характерное время установления равновесия между изучаемой криопротекторной средой и клетками, которое составило $t = 80$ с в присутствии 12 об. % глицерина. Определена концентрация сахарозы (0.16 М), при которой клетка возвращается к исходному объему после инкубации в криопротекторной среде. Показано, что в сперматозоиде человека может находиться 6750 аквапоринов 7-го типа с проницаемостью $P_{AQP7} = 0.00366$ мкм³/с. Проведенные эксперименты показали повышение индекса подвижности сперматозоидов при коррекции концентрации сахарозы в растворе согласно результатам моделирования.

Ключевые слова: криопротектор, глицерин, акваглицеропорин, сперматозоид, модель Кедем–Качальского.

DOI: 10.31857/S0006302924060048, EDN: NLVXVG

Криоконсервация и хранение биологического материала является перспективным направлением современной биологии и медицины. Методы криоконсервации активно используются для сохранения плазмы крови, пуповинной крови, стволовых клеток, срезов тканей, в трансплантологии; позволяют сохранить ткани видов животных, находящихся под угрозой исчезновения; позволяют транспортировать биологический материал на дальние расстояния. Эффективная криоконсервация гамет человека играет важную роль во вспомогательных репродуктивных технологиях [1–6]. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в области криобиологии, биологические, биохимические и физико-химические механизмы криоконсервации до сих пор полностью не изучены [7].

Криоконсервация может приводить к повреждению клеточного материала [8] и снижению выживаемости клеток, иногда до 30% в зависимости от протоколов заморозки/разморозки, а также от исходных показателей биоматериала [9]. Механизмы, лежащие в основе криоповреждений, связаны с осмотическим стрессом, холодовым шоком, образованием внутриклеточных и внеклеточных кристаллов льда, избыточной продукцией активных форм кислорода [10, 11]. Исследования в данной области были сосредоточены на поиске решений, позволяющих минимизировать влияние повреждающих факторов, что привело к разработке и использованию двух основных типов криопротекторов: проникающих и непроникающих внутрь клетки. Проникающие криопротекторы (диметилсульфоксид, глицерин,

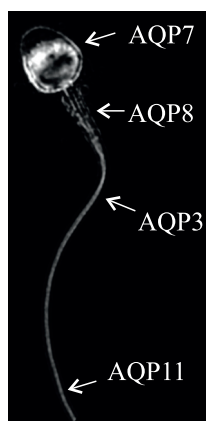


Рис. 1. Локализация аквапоринов в сперматозоиде человека, адаптировано из работы [21].

этиленгликоль и др.) создают осмотический градиент, ограничивающий образование льда и стабилизирующий липидный бислой. Непроницающие компоненты криопротекторной среды (сахариды, белки, липопротеины) выступают в качестве блокаторов льда, что позволяет снизить размеры и количество ядер кристаллизации вне клетки, а также защищают целостность мембран. Криопротекторные среды, используемые в настоящее время для криоконсервации сперматозоидов человека, обычно основаны на водно-глицериновых растворах низкой концентрации (10–15% по объему) с добавлением таких непроницающих компонент, как дисахариды и белки.

Глицерин используется в качестве проникающего внутрь клетки компонента криопротекторных сред, так как он обладает высокой вязкостью, связанной с наличием в его молекуле гидроксильных групп, а также менее токсичен для клеток. В его присутствии образуется пространственная сетка водородных связей, плотность которых в 3 раза больше, чем у одноатомных спиртов. С повышением концентрации глицерина вязкость водно-глицериновой смеси увеличивается, при этом снижается скорость движения молекул растворенного вещества и их кинетическая энергия. Данный эффект приводит к снижению скорости физико-химических процессов в биологических объектах. К числу положительных эффектов глицерина следует отнести также его способность уменьшать размер кристалла льда, поскольку его охлаждение сопровождается сжатием объема, что способствует снижению давления водного льда. Свойство глицерина сжиматься при замерзании является существенным, так как превращение воды в лед не сопровождается увеличением его объема [12]. Стеклоподобное состояние достигается в водных растворах с концентрацией глицерина выше 45% по объему, что является токсичным для клеток [13]. Для заморозки клеток используются

водно-глицериновые растворы с концентрацией 10–15% по объему, поэтому полностью избежать формирования кристаллов в криопротекторных средах не удастся. Для повышения эффективности процессов криоконсервации в среду добавляются непроницающие внутрь клетки компоненты, например, сахара в концентрациях 0.04–0.50 M [14–19].

При кристаллизации льда все больший объем растворителя во внеклеточной среде превращается в лед, концентрация веществ в жидкой фазе резко возрастает. Это приводит к появлению градиента осмотического давления на мембране клетки, которая является единственным препятствием для свободной диффузии в системе. Появление градиента осмотического давления приводит к стремительной дегидратации клетки. Такие процессы могут приводить к осмотическому стрессу с последующей гибелью клеток. Компоненты криопротекторной среды также влияют на осмос клетки [4, 10, 14]. Когда сперматозоид помещают в раствор, который является гипертоническим по отношению к проникающему растворенному веществу (глицерину), но сильно гипотоническим по отношению к непроницаемым солям, он сначала сжимается из-за осмотического оттока внутриклеточной воды, а затем увеличивается в объеме по мере проникновения растворенного вещества и одновременного возвращения воды в клетку [4, 17, 20].

Известно, что глицерин проникает внутрь сперматозоидов через акваглицеропорины. Некоторые аквапорины – трансмембранные белки, служащие каналами для проникновения воды внутрь клетки, – помимо воды пропускают также и глицерин. Было показано, что сперматозоиды человека экспрессируют четыре типа аквапоринов (AQP3, AQP7, AQP8 и AQP11) со специфической локализацией как в плазматической мембране, так и во внутриклеточных органеллах (рис. 1). Из них два аквапорина – 3-го и 7-го типов – являются акваглицеропоринами [21].

Аквапорин 3 (AQP3) – это акваглицеропорин, необходимый для адаптации к изменению осмоса и миграции сперматозоидов. Данный вид аквапоринов локализован в основном участке хвостовой мембраны. Аквапорин 7 (AQP7) – акваглицеропорин, который, как предполагается, способствует транспортировке глицерина в сперматозоидах для использования его в качестве энергетического субстрата. Локализация данного белка до сих пор точно не известна. AQP7 наблюдается в области плазматической мембраны головки сперматозоида, средней части и во внутриклеточных структурах [21].

Согласно исследованию, проведенному на эритроцитах человека, аквапорины играют важную роль в транспорте глицерина через мембрану

клетки, существенно влияя на проницаемость мембраны для данного соединения [22]. В литературных данных нет подробного описания процесса проникновения глицерина в сперматозоиды человека при низких концентрациях, а все протоколы заморозки клеток, как и концентрации компонент в криопротекторной среде, подобраны опытным путем, исходя из морфологической выживаемости клеток. Поэтому в настоящей работе исследуется механизм переноса глицерина через мембрану сперматозоидов при криоконсервации методом математического моделирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Параметры модели. В работе [23] было показано, что сперматозоид человека может считаться идеальным осмометром, подчиняющимся уравнению Бойля–Вант-Гоффа, связывающему равновесный объем клетки и осмоляльность окружающего ее раствора:

$$\frac{V}{V_{\text{iso}}} = \frac{M_{\text{iso}}}{M} \left(1 - \frac{V_b}{V_{\text{iso}}} \right) + \frac{V_b}{V_{\text{iso}}},$$

где V — объем клетки при осмоляльности M , V_{iso} — объем клетки при изотонической осмоляльности M_{iso} , V_b — осмотически неактивный объемом клетки. Член V_b в уравнении представляет собой экстраполированный объем, занимаемый клеткой, когда внешняя осмоляльность становится бесконечной. Он состоит из двух элементов — объема твердых веществ в клетке и объема клеточной воды, который не может выступать в качестве растворителя и, следовательно, не может влиять на осмотическое давление [24].

Два уравнения описывают проникновение глицерина и соответствующее осмотическое изменение объема клетки [25]. Исходя из уравнения Фика, можно показать, что поток глицерина через мембрану пропорционален разнице концентраций внутри и снаружи клетки:

$$\frac{N}{t} = P_{\text{gly}} A (C_{\text{ex}} - C_{\text{in}}),$$

где N — количество молей глицерина в клетке, A — площадь поверхности клетки, C_{ex} и C_{in} — молярные концентрации глицерина вне и внутри клетки соответственно, P_{gly} — коэффициент проницаемости глицерина через мембрану.

Второе уравнение описывает изменение объема внутриклеточной воды, которое необходимо для поддержания осмотического равновесия клетки в ответ на проникновение глицерина. Поскольку проницаемость воды для клеток за счет быстрого переноса воды, как правило, намного больше, чем проницаемость для глицерина, можно считать, что клетки находятся в осмотическом равновесии с внешней средой [26]. В таком случае

скорость, с которой вода входит или выходит из клетки, пропорциональна разнице осмотических давлений внутри и снаружи клетки:

$$\frac{dV}{dt} = -L_p A R T (C_{\text{ex}} + Q_{\text{ex}} - C_{\text{in}} - Q_{\text{in}}).$$

Для учета взаимодействия между молекулами воды и глицерина в модели вводится коэффициент взаимодействия потоков — σ . Данный процесс описывает модель Кедем–Качальского [21]:

$$\frac{dV}{dt} = -L_p A R T [(Q_{\text{ex}} - Q_{\text{in}}) + \sigma (C_{\text{ex}} - C_{\text{in}})], \quad (1)$$

$$\frac{dN}{dt} = \frac{C_{\text{ex}} + C_{\text{in}}}{2} (1 - \sigma) \frac{dV}{dt} + P_{\text{gly}} A (C_{\text{ex}} - C_{\text{in}}), \quad (2)$$

где V — объем сперматозоида, t — время, N — количество молей глицерина в клетке, A — площадь поверхности клетки, C_{ex} и C_{in} — молярные концентрации глицерина вне и внутри клетки соответственно, Q_{ex} и Q_{in} — молярные концентрации солей вне и внутри клетки соответственно, L_p — гидравлическая проводимость, P_{gly} — коэффициент проницаемости глицерина через мембрану, σ — коэффициент отражения, R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура.

Внутриклеточная концентрация солей и глицерина может быть рассчитана следующим образом:

$$Q_{\text{in}} = Q_{\text{in}}(0) \frac{V(0) - V_b - V_{\text{gly}} N(0)}{V - V_b - V_{\text{gly}} N}, \quad (3)$$

$$C_{\text{in}} = \frac{N}{V - V_b - V_{\text{gly}} N}, \quad (4)$$

где $V(0)$, $N(0)$ и $Q_{\text{in}}(0)$ — начальные значения объема, молей глицерина и внутриклеточной концентрации солей, V_{gly} — мольный объем глицерина.

При условии наличия n клеток сперматозоидов в ограниченном объеме можно рассчитать изменение внешних концентраций:

$$Q_{\text{ex}} = Q_{\text{ex}}(0) \frac{V_{\text{out}}}{V_{\text{out}} - n(V - V(0))}, \quad (5)$$

$$C_{\text{ex}} = \frac{(N_{\text{out}} - nN)}{V_{\text{out}} - n(V - V(0))}, \quad (6)$$

где V_{out} и N_{out} — значения объема и количества глицерина в растворе криопротектора при помещении в него n клеток сперматозоидов.

В данной работе уравнения (1) — (6) решались численно в интегрированной среде разработки Spyder на языке программирования Python. Валидация модели проходила на основе экспериментальных данных из работы [20]. Условные обозначения и численные значения параметров при-

Таблица 1. Основные символы, используемые в уравнениях

Символ	Описание	Размерность	Значение
Lp	гидравлическая проводимость	мкм·мин ⁻¹ ·атм ⁻¹	0.77 [20]
Pgly	проницаемость глицерина	см/мин	1.68·10 ⁻³ [27]
A	площадь поверхности	мкм ²	120 [23]
Vb	осмотически неактивный объем	мкм ³	50% [20]
V	объем клетки	мкм ³	переменная
N	моли глицерина в клетке	моль	переменная
C	концентрация глицерина	моль/л	переменная
Q	концентрация солей	моль/л	переменная
σ	коэффициент отражения	—	0.93 [20]
ex	внешний	—	
in	внутренний	—	
Vgly	мольный объем	мл/моль	71 [20]
Viso	изотонический объем	мкм ³	28.5 [20]
n	количество сперматозоидов	—	20·106 [24]
Nout	количество глицерина в растворе	моль	параметр
Vout	объем раствора	мл	0.7

ведены в табл. 1. Как было показано в работе [26], коэффициент проницаемости глицерина P_{gly} зависит от концентрации глицерина в исходном растворе. Валидация модели проходила на основе данных, полученных для 1 М раствора глицерина. Однако в растворе, который используется для криоконсервации сперматозоидов, концентрация глицерина составляет 12% по объему, что составляет примерно 1.6 М. Коэффициент проницаемости глицерина в таком случае был взят из работы [26] и равнялся $P_{gly} = 1.68 \cdot 10^{-3}$, полученный для 1.5 М раствора глицерина.

Дизайн эксперимента. С помощью построенной в работе модели исследовались криопротекторные среды, применяемые на практике в современных клиниках экстракорпорального оплодотворения. Состав криопротекторной среды представлен в табл. 2. В работе исследовались эякуляты доноров, соответствующих критериям нормозооспермии (минимальные критерии основных показателей оценки сперматозоидов в пределах нормальных значений).

Криоконсервация сперматозоидов проводилась по протоколу медленной заморозки: инкубация клеток с криопротекторной средой в соотно-

Таблица 2. Состав криопротекторной среды

Компонент	Концентрация
HEPES	20 мМ
Глицин	10 мМ
Глюкоза	5.56 мМ
Глицерин	1.6 ⁻² М
Сахароза	0.044 М
NaCl	112 мМ
KCl	2.8 мМ
KH ₂ PO ₄	0.4 мМ
MgSO ₄	0.2 мМ
Ca-лактат	1.8 мМ
NaHCO ₃	5 мМ

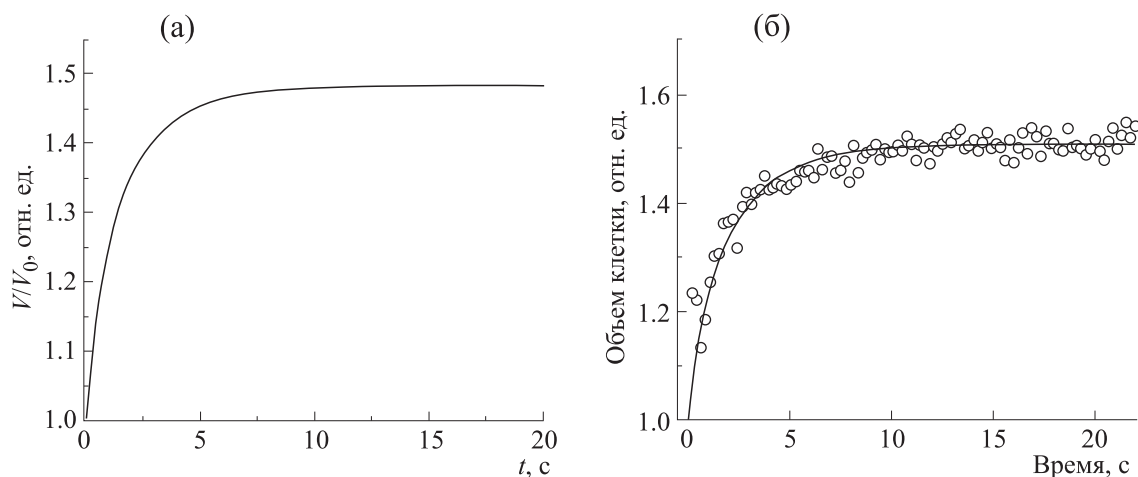


Рис. 2. Изменение объема сперматозоидов в гипоосмотическом растворе (145 мОсм/кг, $T = 22^\circ\text{C}$): (а) — результаты моделирования, (б) — экспериментальные данные; адаптировано из работы [23].

шении 1.0 : 0.7 соответственно в течение 10 мин, затем образцы в три этапа перемещаются в парах азота и инкубируются на каждом этапе 15 мин для достижения системой равновесия, далее образцы погружаются в жидкий азот (-196°C). После хранения в жидком азоте клетки размораживались и подсчитывалось количество подвижных клеток, высчитывался индекс подвижности как отношение подвижных клеток после разморозки к количеству подвижных клеток до заморозки.

Оценка количества аквапоринов. Аквапорины играют существенную роль в проницаемости глицерина. Было показано, что в отсутствии аквапоринов проницаемость клетки для глицерина значительно уменьшается [22]. Поэтому для оценки количества аквапоринов будем считать, что весь поток глицерина идет непосредственно через аквапорины AQP3 и AQP7.

Разделяем поток глицерина на два через AQP3 и AQP7:

$$\frac{dN}{dt} = \frac{dN_{\text{AQP3}}}{dt} + \frac{dN_{\text{AQP7}}}{dt}.$$

Каждый из потоков пропорционален разности концентраций глицерина внутри и снаружи клетки, а также количеству аквапоринов. Назовем проницаемостью AQP3 и AQP7 величину $P_{\text{AQP3,7}}$ — коэффициент пропорциональности. Тогда поток, связанный с отдельным видом аквапоринов, можно выразить следующим образом:

$$\frac{dN_{\text{AQP3,7}}}{dt} = P_{\text{AQP3,7}} N_{\text{AQP3,7}} (C_{\text{ex}} - C_{\text{in}}),$$

где $N_{\text{AQP3,7}}$ — количество аквапоринов 3-го (7-го) типов.

Для человеческого эритроцита известен коэффициент проницаемости для аквапорина 3-го ти-

па ($P = 1.4 \cdot 10^{-6}$ см/с) [27], а также оценка количества поринов данного типа — 2500 копий [28]. Известна также и площадь самого эритроцита: $S = 136 \text{ мкм}^2$ [29]. Таким образом, исходя из предположения о том, что порины в одном семействе имеют схожие характеристики, приходим к уравнению: $P_{\text{AQP3,7}} N_{\text{AQP3,7}} = PS$. Отсюда $P_{\text{AQP3,7}} = 7.616 \cdot 10^{-4} \text{ см}^3/\text{с}$.

В работе [30] была получена оценка отношения населенности аквапоринов 3-го и 7-го типов для сперматозоида быка:

$$\frac{N_{\text{AQP3}}}{N_{\text{AQP7}}} = \frac{0.889}{0.726} = 1.2245 = \gamma$$

Таким образом, получаем уравнение:

$$\frac{dN}{dt} = (P_{\text{AQP7}} + \gamma P_{\text{AQP3}}) N_{\text{AQP7}} (C_{\text{ex}} - C_{\text{in}}). \quad (7)$$

С помощью программы были исследовались зависимости $N(t)$ от параметров P_{AQP7} и N_{AQP7} . Для подбора оптимальных параметров полученная функция сравнивалась с экспериментальной кривой, на которой валидировалась модель. Наилучшими параметрами являются те, которые дают наименьшее отклонение от нее.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Валидация модели и подбор параметров L_p и P_{gly} проводились на основании экспериментальных данных из работы [23]. Также на основании данных из работ [23, 31] определен параметр σ , равный 0.93. На первом этапе моделировался перенос воды через мембраны сперматозоидов при погружении в гипоосмотический раствор 145 мОсм/кг (рис. 2). При валидации модели был определен следующий коэффициент проводимо-

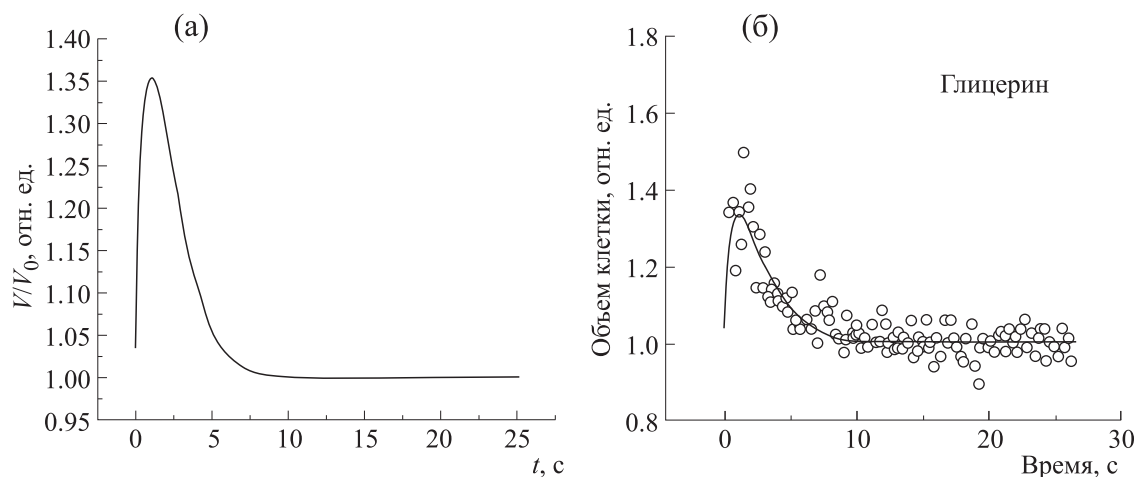


Рис. 3. Изменение объема сперматозоида при наличии потока глицерина (1 М): (а) — результат моделирования, (б) — экспериментально полученная зависимость объема клетки от времени при выходе из клетки криопротектора.

сти $L_p = 1.84 \text{ мкм} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{атм}^{-1}$. На втором этапе моделирования был учтен поток глицерина в сперматозоид через акваглицеропорины. По результатам моделирования были получены следующие коэффициенты проводимости и проницаемости соответственно: $L_p = 0.77 \text{ мкм} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{атм}^{-1}$ и $P_{\text{gly}} = 0.21 \cdot 10^{-2} \text{ см/мин}$. Анализ изменения объема сперматозоида в присутствии потока глицерина (1 М) через акваглицеропорины представлен на рис. 3. Образец погружали в 1 М раствор глицерина и дожидались установления равновесия при комнатной температуре. Затем образец резко погружали в изотонический раствор без криопротектора. Коэффициент проницаемости воды уменьшается при наличии в растворе проникающего в клетку криопротектора, что согласуется с данными работ [2, 32].

Основная задача данной работы - оценка изменений, происходящих в сперматозоиде при криоконсервации не в 1 М глицерин-содержащем растворе, а в реальной криопротекторной среде, используемой в различных лабораториях вспомогательных репродуктивных технологий. Поэтому было проведено моделирование и получена зависимость изменения относительного объема клетки для криопротекторной среды, содержащей 12 об.% глицерина вначале без сахарозы (рис. 4), а затем с добавлением сахарозы в различных концентрациях (рис. 5).

При повышении концентрации глицерина среда становится гиперосмотической. Зависимость изменения относительного объема клетки от времени представляет собой двухфазную кривую с начальным быстрым уменьшением объема, за которым следует его увеличение (рис. 4). В на-

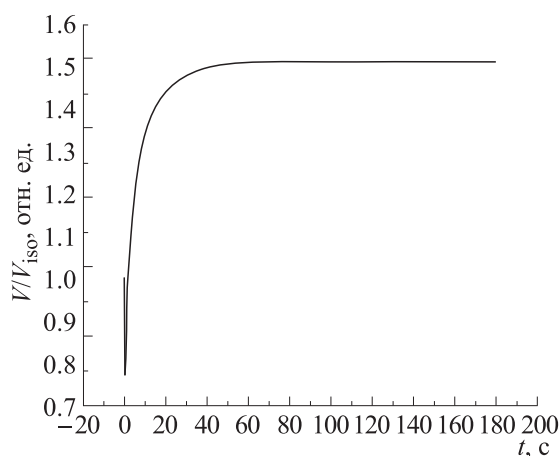


Рис. 4. Зависимость относительного объема клетки от времени для криопротекторного раствора (12 об.% глицерина) без сахарозы.

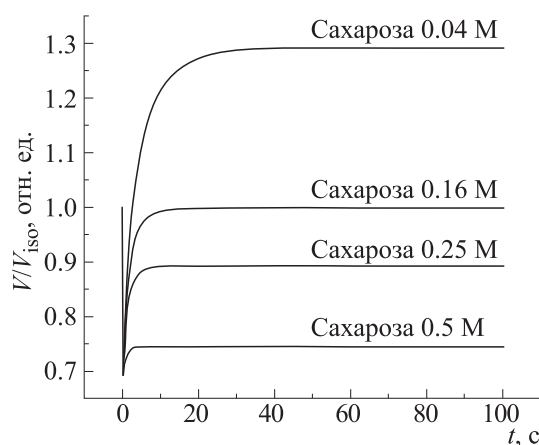


Рис. 5. Зависимость относительного объема клетки от времени для криопротекторного раствора (12 об.% глицерина) с разными концентрациями сахарозы.

чальный момент времени происходит быстрый отток воды из клетки, так как раствор криопротекторной среды является гипертоническим по отношению к содержимому клетки. Клетка при этом достигает минимального значения объема, составляющего 77% от изначального, за $t = 0.27$ с. Далее клетка постепенно набухает за счет направленного внутрь клетки потока глицерина и сопутствующего ему потока воды, пока не будет достигнуто осмотическое равновесие. После быстрого уменьшения объема, дойдя до значения 77% от изначального, клетка постепенно увеличивается в объеме, проходя начальное состояние, пока не достигнет объема, составляющего 151% от изначального, что необходимо для достижения осмотического равновесия с внешней средой. По данной зависимости можно судить о характерном времени установления равновесия между клеткой и окружающей средой (время достижения клеткой максимального объема). Установлено, что время достижения клеткой равновесного объема в среде, содержащей 12 об. % глицерина без сахарозы, составляет 80 с.

Также было исследовано изменение объема клетки при добавлении в криопротекторную среду сахарозы в различных концентрациях (рис. 5). Видно, что наличие сахарозы не влияет на общий профиль зависимости: так же наблюдается резкое уменьшение объема клетки за счет быстрого оттока воды из-за большой разницы осмотических давлений и последующее его увеличение, связанное с потоком глицерина внутрь клетки. Однако отмечено, что концентрация сахарозы влияет на характерные минимальные и максимальные размеры, достигаемые клеткой после погружения в криопротекторную среду. При увеличении концентрации сахарозы внешний раствор становится все более гипертоническим, поэтому при погружении в него клетка теряет больший свой объем на начальном этапе. Так, для растворов 0.04 М, 0.25 М и 0.5 М сахарозы значения наименьшего объема (V_{\min}) составляют соответственно 76, 73 и 69% от начального. Добавление сахарозы в криопротекторную среду также влияет на конечный объем, достигаемый клеткой при достижении равновесия и на время, необходимое для достижения этого равновесия. Для растворов 0.04 М, 0.25 М и 0.5 М сахарозы значения равновесного объема (V_{\max}) составляют соответственно 129, 89 и 73% от начального, а времена достижения равновесия $t = 50, 15$ и 5 с соответственно. Таким образом, при увеличении концентрации сахарозы в криопротекторной среде уменьшается конечный объем клетки, достигаемый при инкубации в растворе.

Исследованные в модельной системе концентрации сахарозы чаще всего используются в создании коммерческих криопротекторных сред.

Однако результаты моделирования показывают, что ни одна из выбранных концентраций сахарозы не возвращают клетку в первоначальный объем при достижении равновесия с внешней средой. Таким образом, изменяя концентрации сахарозы в криопротекторной среде, можно добиться различных конечных объемов клеток, что может повлиять на выживаемость при дальнейшей криоконсервации. С помощью построенной модели было рассчитано, что при концентрации сахарозы 0.16 М в криопротекторной среде сперматозоид при достижении равновесия вернется к своему первоначальному объему. Минимальный объем клетки для такого раствора составляет 74% от изначального, а время выхода на равновесный объем $t = 24$ с.

Проведенное исследование показывает, что клетке для насыщения глицерином достаточно находиться в криопротекторной среде порядка нескольких минут (80 с для раствора без сахарозы). Таким образом, классический протокол заморозки, включающий инкубацию клеток в криопротекторной среде в течение 10 минут, может быть оптимизирован. Данное предположение было проверено экспериментально на сперматозоидах человека. Образец клеток донора инкубировали в криопротекторной среде 2 мин, исходя из результатов моделирования. После инкубации клетки замораживали и размораживали в соответствии с протоколами, используемыми в клиниках вспомогательных репродуктивных технологий. После разморозки оценивался индекс подвижности клеток, соответствующий степени их выживаемости. Результаты сравнивались с контрольными клетками того же донора, замороженными в соответствии с классическими клиническими протоколами, требующие первоначальной инкубации клеток в криопротекторной среде на протяжении 10 мин. Результаты анализа криоконсервации образцов клеток 13 доноров с установленной нормозооспермией (по критериям Всемирной организации здравоохранения) представлены в табл. 3.

Показано, что статистически значимых различий (с уровнем значимости $p = 0.05$) в индексе подвижности сперматозоидов для разных времен инкубации в криопротекторной среде нет. На основании данных, полученных из модели и проверенных в эксперименте, можно сделать вывод о том, что время инкубации сперматозоидов в криопротекторной среде перед криоконсервацией может быть сокращено до 2 мин. Ранее мы обращали внимание на то, что инкубация сперматозоидов в криопротекторной среде повышает у них степень фрагментации ДНК после разморозки, так как проникающие криопротекторы являются цитотоксическими [33]. Сокращение времени инкубации клеток до заморозки поможет сохранить большее число клеток с целостной ДНК.

Таблица 3. Значения индексов подвижности для различных доноров в зависимости от времен инкубации

Время инкубации в криопротекторной среде	10 мин	2 мин
Среднее значение индекса подвижности клеток после криоконсервации в глицеринсодержащем криопротекторном растворе	0.34 ± 0.06	0.32 ± 0.06
Концентрация сахарозы в криопротекторной среде	0.04 М	0.16 М
Среднее значение индекса подвижности клеток	0.48 ± 0.09	0.59 ± 0.08

Также были проведены предварительные эксперименты по сравнению индекса подвижности клеток после криоконсервации в среде с концентрацией сахарозы 0.04 М (соответствует коммерческим криопротекторным средам) и 0.16 М, при которой клетка возвращается к своему изначальному объему (получена в результате моделирования). В ходе эксперимента было обнаружено, что в среде с концентрацией сахарозы 0.16 М индекс подвижности сперматозоидов на 8% выше, чем в коммерческой криопротекторной среде. Таким образом результаты моделирования предлагают пути оптимизации состава криопротекторной среды и протокола криоконсервации для повышения выживаемости клеток.

Построенная модель позволила провести оценку количества аквапоринов 7-го и 3-го типов в сперматозоиде человека, что ранее не проводилось. При решении уравнения (7) мы проводили калибровку параметров P_{AQP7} и N_{AQP7} , чтобы свести его к решению уравнения (2). В результате варьирования параметров были получены следующие результаты: проницаемость одного аквапориона 7-го типа $P_{AQP7} = 0.00366 \text{ мкм}^3/\text{с}$; количество аквапоринов 7-го типа составляет $N_{AQP7} = 6750$, а 3-го типа — $N_{AQP3} = 8265$.

ВЫВОДЫ

Таким образом различные концентрации отдельных компонент криопротекторных сред могут влиять на изменение объема клеток и степень выживаемости после криоконсервации. В работе представлена модель проникновения водного раствора глицерина 12 об.% через мембрану сперматозоидов человека. С помощью построенной модели была изучена динамика изменения объема клетки в зависимости от концентрации отдельных компонент криопротекторной среды; рассчитано характерное время установления равновесия между изучаемой криопротекторной средой и клетками, которое составило 80 с. Рассчитана концентрация сахарозы (0.16 М), при которой клетка возвращается к исходному объему. Проведенные эксперименты по оценке индекса подвижности клеток показали, что время инкубации клеток в криопротекторной среде перед за-

морозкой может быть сокращено с 10 до 2 мин, а повышение концентрации сахарозы до 0.16 М повышает степень выживаемости клеток. Результаты моделирования и проведенные эксперименты позволяют скорректировать привычные протоколы криоконсервации сперматозоидов человека. Созданная модель позволила оценить количество аквапоринов AQP7 в сперматозоиде человека, что составило 6750 копий, и количество аквапоринов AQP3, что составило 8265 копий.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность А.В. Романовой за помощь с оформлением и адаптацией рисунков к статье.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках проекта 23-Ш01-15 междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ имени М.В. Ломоносова «Фундаментальные и прикладные исследования космоса».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kroløkke C. Life in the cryo-kennel: The 'exceptional' life of frozen pet DNA. *Soc. Stud. Sci.*, **49** (2), 162–169 (2019). DOI: 10.1177/0306312719837610
2. Hildebrandt T. B., Hermes R., Goeritz F., Appeltant R., Colleoni S., de Mori B., Diecke S., Drukker M., Galli C., Hayashi K., Lazzari G., Loi P., Payne J., Renfree M., Seet S., Stejskal J., Swegen A., Williams SA, Zainuddin Z. Z., Holtze S. The ART of bringing extinction to a freeze — History and future of species conserva-

- tion, exemplified by rhinos. *Theriogenology*, **169**, 76–88 (2021). DOI: 10.1016/j.theriogenology.2021.04.006
3. Jaiswal A. N. and Vagga A. Cryopreservation: A review article. *Cureus* **14** (11), e31564 (2022). DOI: 10.7759/cureus.31564
 4. Elliott G. D., Wang S., and Fuller B. J. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology* **76**, 74–91 (2017). DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.04.004
 5. Žáková J., Lousová E., Ventrubá P., Crha I., Pochopová H., Vinklárková J., Tesařová E., and Nussir M. Sperm cryopreservation before testicular cancer treatment and its subsequent utilization for the treatment of infertility. *Sci. World J.*, **2014**, 575978 (2014). DOI: 10.1155/2014/575978
 6. Tamburrino L., Traini G., Marcellini A., Vignozzi L., Baldi E., and Marchiani S. Cryopreservation of human spermatozoa: functional, molecular and clinical aspects *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (5), 4656 (2023). DOI: 10.3390/ijms24054656
 7. Hezavehei M., Sharafi M., Kouchesfahani H. M., Henkel R., Agarwal A., Esmaeili V., and Shahverdi A. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod. Biomed. Online*, **37** (3), 327–339 (2018). DOI: 10.1016/j.rbmo.2018.05.012
 8. Colás C., Junquera C., Pérez-Pé R., Cebrián-Pérez J. A., and Muíño-Blanco T. Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold-shock. *Microsc. Res. Technique*, **72** (8), 566–572 (2009). DOI: 10.1002/jemt.20710
 9. Aliakbari F., Taghizabet N., Azizi F., Rezaei-Tazangi F., Gelehkolae K. S., and Kharazinejad E. A review of methods for preserving male fertility. *Zygote*, **30**, 289–297 (2022). DOI: 10.1017/S0967199421000071
 10. Gao D. and Critser J. K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J.*, **41** (4), 187–196 (2000). DOI: 10.1093/ilar.41.4.187
 11. Chatterjee S. and Gagnon C., Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol. Reprod. Devel.*, **59** (4), 451–458 (2001). DOI: 10.1002/mrd.1052
 12. Белоус А. М. и Грищенко В. И. *Криобиология* (Наук. думка, Киев, 1994).
 13. Popov I., Greenbaum (Gutina) A., Sokolov A. P., and Feldman Y. The puzzling first-order phase transition in water–glycerol mixtures. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17** (27), 18063–18071 (2015). DOI: 10.1039/C5CP02851E
 14. Ozimic S., Ban-Frangez H., and Stimpfel M. Sperm cryopreservation today: approaches, efficiency, and pitfalls. *Curr. Issu. Mol. Biol.*, **45** (6), 4716–4734 (2023). DOI: 10.3390/cimb45060300
 15. A. M. Hossain, C. O. Osuamkpe, *Archives of Andrology* **53** (2), 99 (2007). DOI: 10.1080/01485010701225675
 16. K. Murata and H. Tanaka, General nature of liquid-liquid transition in aqueous organic solutions. *Nature Commun.*, **4**, 2844 (2013). DOI: 10.1038/ncomms3844
 17. Fuller B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo Lett.*, **25** (6), 375–388 (2004). PMID: 15660165
 18. Roy S., Arora S., Kumari P., and Ta M. A simple and serum-free protocol for cryopreservation of human umbilical cord as source of Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Cryobiology*, **68** (3), 467–472 (2014). DOI: 10.1016/j.cryobiol.2014.03.010
 19. Gurruchaga H., del Burgo L. S., Garate A., Delgado D., Sanchez P., Orive G., Ciriza J., Sanchez M. and Pedraz J. L. Cryopreservation of human mesenchymal stem cells in an allogeneic bioscaffold based on platelet rich plasma and synovial fluid. *Sci Rep.*, **7** (1), 15733 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-16134-6
 20. Arutyunyan I. V., Kananykhina E. Yu., Elchaninov A. V., and Fatkhudinov T. Kh. Influence of sucrose on the efficiency of cryopreservation of human umbilical cord-derived multipotent stromal cells with the use of various penetrating cryoprotectants. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **171** (1), 150 (2021). DOI: 10.1007/s10517-021-05187-3
 21. Gao D. Y., Mazur P., Kleinhans F. W., Watson P. F., Noiles E. E., and Critser J. K. Glycerol permeability of human spermatozoa and its activation energy. *Cryobiology*, **29** (6), 657–667 (1992). DOI: 10.1016/0011-2240(92)90068-d
 22. Pellavio G. and Laforenza U. Human sperm functioning is related to the aquaporin-mediated water and hydrogen peroxide transport regulation. *Biochimie*, **188**, 45–51 (2021). DOI: 10.1016/j.biochi.2021.05.011
 23. Gilmore J. A., McGann L. E., Liu J., Gao D. Y., Peter A. T., Kleinhans F. W., and Critser J. K. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, **53** (5), 985–995 (1995). DOI: 10.1095/biolreprod53.5.985
 24. Nobel P. S. The Boyle–Van't Hoff relation. *J. Theor. Biol.*, **23** (3), 375 (1969). DOI: 10.1016/0022-5193(69)90025-3
 25. *Life in the Frozen State*, Ed. by B. J. Fuller, N. Lane, and E. E. Benson (CRC Press, Boca Raton, USA, 2004). DOI: 10.1201/9780203647073
 26. Lahmann J. M., Benson J. D., and Higgins A. Z. Concentration dependence of the cell membrane permeability to cryoprotectant and water and implications for design of methods for post-thaw washing of human erythrocytes. *Cryobiology*, **80**, 1–11 (2018). DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.12.003
 27. Roudier N., Ripoché P., Gane P., Le Pennec P. Y., Daniels G., Cartron J.-P., and Bailly P. AQP3 deficiency in humans and the molecular basis of a novel blood group system, GIL. *J. Biol. Chem.*, **277** (48), 45854–45859 (2002). DOI: 10.1074/jbc.M208999200
 28. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*, 6th ed. (World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2021).

29. Roudier N., Verbavatz J.-M., Maurel C., Ripoche P., and Tacnet F. Evidence for the presence of aquaporin-3 in human red blood cells. *J. Biol. Chem.*, **273** (14), 8407–8412 (1998). DOI: 10.1074/jbc.273.14.8407
30. Rodriguez R. A., Liang H., Chen L. Y., Plascencia-Villa G., and Perry G. Single-channel permeability and glycerol affinity of human aquaglyceroporin AQP3. *Biochim. Biophys. Acta — Biomembranes*, **1861** (4), 768–775 (2019). DOI: 10.1016/j.bbamem.2019.01.008
31. Kuche P. W., Cox C. D., Daners D., Shishmarev D., and Galvosas P. Surface model of the human red blood cell simulating changes in membrane curvature under strain. *Sci. Rep.*, **11** (1), 13712 (2021). DOI: 10.1038/s41598-021-92699-7
32. Kedem O. and Katchalsky A. Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **27**, 229–246 (1958). DOI: 10.1016/0006-3002(58)90330-5
33. Du J., Kleinhans F. W., Mazur P., and Critser J. K. Human spermatozoa glycerol permeability and activation energy determined by electron paramagnetic resonance. *Biochim. Biophys. Acta — Biomembranes*, **1194** (1), 1–11 (1994). DOI: 10.1016/0005-2736(94)90196-1
34. Fujii T., Hirayama H., Fukuda S., Kageyama S., Naito A., Yoshino H., Moriyasu S., Yamazaki T., Sakamoto K., Hayakawa H., Takahashi K., Takahashi Y., and Sawai K. Expression and localization of aquaporins 3 and 7 in bull spermatozoa and their relevance to sperm motility after cryopreservation. *J. Reprod. Devel.*, **64** (4), 327–335 (2018). DOI: 10.1262/jrd.2017-166

Transport of Glycerol Through the Human Sperm Membrane during Cryopreservation

A.A. Ivanova*, I.I. Leonov*, E.S. Gnilyozub-Volobueva*, M.A. Ovchinnikov**,
S.A. Yakovenko*, and E.Yu. Simonenko*

*Physical faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1/2, Moscow, 119991 Russia

**Skobeltsyn Institute of Nuclear Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1/2, Moscow, 119991 Russia

Cryopreservation of biological material is an important task in many areas of biology and medicine especially for assisted reproductive technologies. Cryoprotective media including cell-penetrating and non-penetrating components are used for effective cryopreservation of cells. Usually glycerol in various concentrations acts as a penetrating component. However, elucidating the mechanisms of the cryoprotective action of these compounds as well as increasing the proportion of surviving cells after cryopreservation remain urgent objective of cryobiology. The work examines the mechanism of glycerol transfer through sperm membranes with the participation of aquaporins using the method of mathematical modeling. The presented model describes dynamics of changes in sperm volume depending on the concentration of glycerol and sucrose in the cryoprotective medium. As a result of the analysis the characteristic time for establishing equilibrium between the studied cryoprotective medium and cells was calculated and amounts to $t = 80$ s in the presence of glycerol 12% vol. The concentration of sucrose (0.16 M) at which the cell returns to its original volume after incubation in a cryoprotective medium was determined. It has been shown that human sperm can contain 6750 AQP7 with a permeability $P_{\text{AQP7}} = 0.00366 \mu\text{m}^3/\text{s}$. The experiments performed showed an increase in the sperm motility index when correcting the concentration of sucrose in the solution according to the modeling results.

Keywords: cryoprotectant, glycerol, aquaglyceroporin, spermatozoon, Kedem–Kachalsky model