

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ВКЛЮЧЕНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОЛЬНО МЕТИЛИРОВАННЫХ БЕТА-ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ КРИОТОЛЕРАНТНОСТИ СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. А.Г. Миронова\*, \*\*, #, С.И. Афанасьева\*\*\*, С.А. Яковенко\*\*\*,  
А.Н. Тихонов\*\*, \*\*\*, Е.Ю. Симоненко\*\*\*

\*Клиника репродукции человека «Альтравита», ул. Нагорная, 4А, Москва, 117186, Россия

\*\*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

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

#E-mail: agm90@mail.ru

Поступила в редакцию 14.09.2024 г.

После доработки 14.09.2024 г.

Принята к публикации 16.10.2024 г.

Исследованы криозащитные свойства комплексов включения холестерина на основе RAMEB — произвольно метилированных производных бета-циклодекстринов (randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin) в отношении сперматозоидов человека. Изучено взаимодействие различных концентраций RAMEB и комплексов включения холестерина на основе RAMEB с мембранами сперматозоидов. Показано, что выраженная цитотоксичность RAMEB в отношении сперматозоидов обусловлена взаимодействием циклодекстринов с липидными компонентами мембраны, в частности экстракцией холестерина. Комплексы RAMEB с холестерином обладают значительно менее выраженной цитотоксичностью. Установлена зависимость между концентрацией холестерина в мембранах сперматозоидов и концентрацией комплексов RAMEB с холестерином в образце. Показано, что инкубация сперматозоидов перед криоконсервацией с 2 мг/мл комплексов RAMEB с холестерином статистически значимо повышает выживаемость (на 13.8%) и долю прогрессивно подвижных сперматозоидов (на 14.8%) после разморозки. Методом рентгеноструктурного анализа показано, что присутствие в образцах RAMEB и комплексов RAMEB с холестерином в исследуемых концентрациях (2, 4 и 8 мг/мл) не влияет на средний размер кристаллов льда, формирующихся в образце при криоконсервации. Предложен механизм криопротекторного действия комплексов RAMEB с холестерином.

*Ключевые слова:* криоконсервация, сперматозоид, мембрана, холестерин метил-бета-циклодекстрины, RAMEB.

DOI: 10.31857/S0006302924060249, EDN: NJBHOH

Первые попытки криоконсервации сперматозоидов были предприняты около 250 лет назад итальянским священником Лазаро Спалланцани, который подвергал сперму воздействию отрицательных температур, используя для этих целей снег [1]. Дальнейший научный прогресс в криобиологии был достигнут значительно позже, когда в 1949 г. были открыты криопротекторные

свойства глицерина [2]. Первый ребенок, рожденный в результате использования криоконсервированной спермы, появился на свет в 1953 г. [3]. На сегодняшний день криоконсервация сперматозоидов является неотъемлемой частью вспомогательных репродуктивных технологий [4].

Криоконсервация сперматозоидов рекомендована мужчинам, страдающим онкологическими, аутоиммунными и другими заболеваниями, сопряженными с потенциально высокими рисками нарушения репродуктивной функции, а также пациентам, которым предстоит химио- или радиотерапия [5, 6]. Криоконсервация может быть назначена пациентам с тяжелыми и/или прогрес-

*Сокращения:* RAMEB — произвольно метилированные производные  $\beta$ -циклодекстрина (randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin), М $\beta$ -ЦД — метил-бета-циклодекстрины, М $\beta$ -ЦД-Х — комплексы метил-бета-циклодекстринов с холестерином, DPBS — раствор Дюльбекко с кальцием и магнием (Dulbecco's phosphate-buffered saline).

сирующими формами олиго-, астенозооспермии, в том числе в момент улучшения показателей спермограммы, достигнутых в процессе андрологического лечения [7]. Возможность криоконсервации единичных сперматозоидов, полученных у мужчин с диагнозом азооспермия посредством микрохирургической биопсии тестикулярных сперматозоидов, позволяет избежать повторные операции [8]. Криоконсервация сперматозоидов позволяет создавать криобанки донорской спермы без риска передачи ВИЧ, гепатитов В и С и сифилиса реципиенту благодаря возможности проведения надлежащего скрининга [9].

Ввиду большого объема замораживаемого объема для криоконсервации сперматозоидов рутинно используется технология медленной заморозки [10]. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в криобиологии в целом, эффективность технологии медленной заморозки остается достаточно низкой: 40–60% процентов сперматозоидов (от изначального количества подвижных сперматозоидов в нативном образце) утрачивают подвижность после разморозки [11].

Большинство криоповреждений биологических объектов прямо или косвенно связаны с образованием вне- и внутриклеточных кристаллов льда [12]. Было установлено, что для сперматозоидов основными факторами, приводящими к гибели клеток, являются осмотический дисбаланс и повреждение мембраны [13]. При понижении температуры структура липидов мембраны трансформируется, в основном за счет фазово-структурных переходов [14]. В области фазовых переходов липидных молекул сосуществование в бислое областей жидкокристаллической и гелевой фаз становится причиной образования микродефектов в структуре мембраны [15], а перераспределение мембранных белков в конечном итоге приводит к образованию белковых агрегатов [16], что ведет к необратимой потере некоторых функций мембраны. Осмотические эффекты, связанные с формированием внеклеточных кристаллов льда, а также с добавлением и удалением криопротекторов, вносят существенный вклад в повреждение плазматической мембраны [17].

Степень криоповреждений мембран зависит от скорости замораживания-оттаивания, природы и концентрации криопротекторов, фосфолипидного состава и степени гидратированности, а также от содержания холестерина [14]. Известно, что холестерин, локализованный в составе липидов мембраны, регулирует упаковку [18] и контролирует динамичность липидных молекул (подвижность, вращение, латеральную диффузию), что приводит к модулированию ряда свойств и функций мембраны, таких как толщина мембраны, ее текучесть, проницаемость для воды и других молекул, а также температура и степень ко-

оперативности фазового перехода [19]. Доказано, что добавление холестерина препятствует переходу липидов в гексагональную фазу ( $H_{II}$ ) [20].

В связи с таким влиянием холестерина на свойства плазматической мембраны во многих исследованиях изучалась гипотеза о холестерин-опосредованном повышении устойчивости мембран к повреждениям, вызванным криоконсервацией.

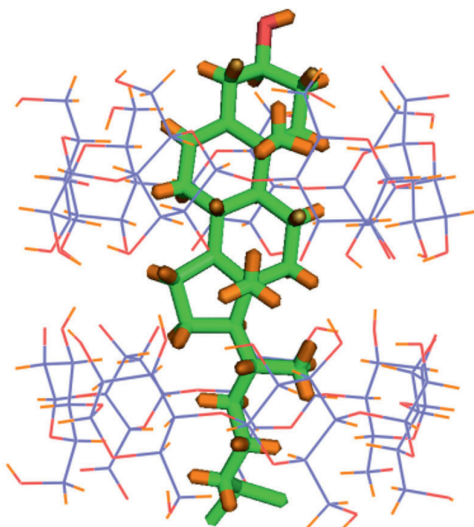
Важной особенностью мембраны сперматозоидов является физиологическая перестройка в процессе капацитации, состоящем из гиперактивации и акросомальной реакции, необходимых для оплодотворения. Процесс гиперактивации сопровождается оттоком холестерина с плазматической мембраны сперматозоидов, повышением ее текучести и проницаемости, изменением мембранного потенциала, а также гиперполяризацией мембраны [21, 22]. Однако преждевременная активация сперматозоидов, например, при криоконсервации, ведет к гибели клеток.

В исследованиях, проводившихся на сперме разных видов млекопитающих, была обнаружена строгая корреляция между молярным процентом холестерина в плазматической мембране и криотолерантностью сперматозоидов. Наибольшей криотолерантностью обладают сперматозоиды кролика, в их мембранах молярный процент холестерина равен 62%, а на последнем месте — сперматозоиды барана — 38% [23]. Насыщение мембраны сперматозоидов холестерином приводит к повышению их криотолерантности [24–27].

Молекула холестерина гидрофобна и нерастворима в полярных растворителях. Для того, чтобы доставить холестерин к мембране сперматозоидов, требуется «молекула-переносчик». В качестве таких «переносчиков» могут быть использованы циклодекстрины.

Циклодекстрины представляют собой циклические олигосахариды, состоящие из остатков D-(+)-глюкопиранозы, связанных  $\alpha$ -D-1,4-гликозидной связью [28]. Циклодекстрины обладают гидрофильной внешней поверхностью и гидрофобной внутренней полостью, способной образовывать комплексы включения с широким спектром гидрофобных гостевых молекул [29].

Включение происходит в основном за счет гидрофобных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий [30]. Номенклатура циклодекстринов определяется количеством остатков глюкозы в их структуре. Так, гексамер глюкозы обозначается как  $\alpha$ -циклодекстрин, гептамер —  $\beta$ -циклодекстрин, а октомер —  $\gamma$ -циклодекстрин [31]. Степень полимеризации определяет размер гидрофобной полости и, следовательно, сродство носителя к определенным классам соединений [32]:  $\alpha$ -циклодекстрины обладают наивысшим сродством к фосфолипидам, а  $\beta$ -циклодекстрины — к холесте-



**Рис. 1.** Комплекс включения холестерина на основе  $\beta$ -ЦД: в результате взаимодействия двух молекул  $\beta$ -ЦД с молекулой холестерина последняя оказывается инкапсулированной с обоих концов: стероидное ядро входит в полость одной молекулы  $\beta$ -ЦД, а боковая цепь — в полость другой [35].

рину [33]. Стоит отметить, что полость одиночной молекулы  $\beta$ -циклодекстрина ( $\sim 8 \text{ \AA}$ ) слишком мала, чтобы полностью экранировать молекулу холестерина ( $\sim 18 \text{ \AA}$ ) от молекул воды [34]. Существование комплекса включения холестерина на основе  $\beta$ -циклодекстрина со стехиометрией 1 : 2 было неопровержимо доказано с помощью дифракционного анализа (рис. 1) [35].

Применение нативных  $\beta$ -циклодекстринов затруднено из-за их низкой растворимости в полярных растворителях (18.8 г/л при  $25^\circ\text{C}$  для воды) [36]. Растворимость  $\beta$ -циклодекстрина и комплексов включения на его основе может быть значительно повышена модификацией гидроксильных групп различными заместителями [37]. Метилированные производные  $\beta$ -циклодекстрина, такие как 2,6-ди-О-метил- $\beta$ -циклодекстрин и 2,3,6-три-О-метил- $\beta$ -циклодекстрин, известны своей высокой растворимостью в воде ( $> 300 \text{ г/л}$ ) [38]. Однако, в связи с трудоемкостью синтеза дивалентного производного  $\beta$ -циклодекстрина [39], использование произвольно замещенных метилированных производных (RAMEB — randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin) в настоящее время является предпочтительным [40].

Целью данной работы было исследование взаимодействия метилированных  $\beta$ -циклодекстринов (М $\beta$ -ЦД) и их комплексов с холестерином (М $\beta$ -ЦД-Х) с мембранами сперматозоидов, оценка их роли в выживаемости клеток после криоконсервации и выявление потенциальных механизмов их криозащитных свойств.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Реактивы, использованные в работе:** набор реактивов для определения холестерина «Холестерин-ФКД» (ООО «Агат-Мед», Россия); набор для оценки жизнеспособности сперматозоидов Vital Screen (FertiPro, Бельгия); раствор Дюльбекко с кальцием и магнием — DPBS («Панэко», Россия); произвольно метилированные бета-циклодекстрины RAMEB (степень замещения (degree of substitution)  $DS = 1.5\text{--}2.1$  метильных групп на каждый остаток глюкозы) (Sigma, США); холестерин (Sigma, США); среда Sperm Wash (Vitromed, Германия); среда All Grad Wash (Vitromed, Германия); криопротекторная среда Sperm Freeze (Vitromed, Германия);

Работа проводилась на образцах спермы доноров. Оценку концентрации и подвижности сперматозоидов осуществляли в камере Маклера в соответствии с критериями ВОЗ [41]. Оценку подвижности производили по четырем категориям: а — быстрое прямолинейное движение, b — медленное прямолинейное движение, c — не прямолинейное движение, d — неподвижные сперматозоиды.

**Оценка интактности мембраны сперматозоидов.** Для оценки доли сперматозоидов с интактной мембраной использовали стандартный набор Vital Screen. В основе анализа Vital Screen лежит окраска образца красителями эозином и нигрозинном. Поскольку краситель эозин проникает только в клетки с поврежденной плазматической мембраной, метод позволяет оценить долю живых клеток в образце. Для каждого образца оценивали не менее 200 сперматозоидов.

**Выделение подвижной фракции сперматозоидов и определение цитотоксичности М $\beta$ -ЦД и М $\beta$ -ЦД-Х.** Для выделения подвижной фракции сперматозоидов использовали метод центрифугирования в градиенте плотности (90% и 45% All Grad Wash : Sperm Wash (об./об.)). На 1 мл 90%-го градиента наслаивали 1 мл 45%-го градиента, затем наслаивали 2 мл эякулята и центрифугировали при 400 g в течение 7 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 2 мл среды Sperm Wash и центрифугировали при 500 g в течение 10 мин. Отбирали супернатант, к осадку добавляли 2 мл среды Sperm Wash и повторно центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в объеме среды Sperm Wash, необходимом для достижения концентрации сперматозоидов в образце, равной 100 млн/мл. Полученную клеточную суспензию делили на аликвоты по 50 мкл и добавляли к этим аликвотам по 50 мкл среды Sperm Wash, содержащей 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 и 12.8 мг М $\beta$ -ЦД или 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 и 3.2 мг М $\beta$ -ЦД-Х. К контрольному образцу добавляли 50 мкл среды Sperm Wash. Образцы инкубировали при  $25^\circ\text{C}$ , а через 15, 30 и



60 мин производили оценку доли сперматозоидов с интактной мембраной.

**Оценка экстракционной способности Мβ-ЦД.** К эякуляту добавляли среду DPBS в соотношении 1 : 2 (об./об.) и центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Отбирали супернатант, полученный осадок ресуспендировали в 2 мл среды DPBS и центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Осадки от нескольких эякулятов объединяли, оценивали концентрацию клеток с помощью камеры Маклера (не менее 3 раз в разных аликвотах) и разделяли на аликвоты по 100 мкл. К аликвотам добавляли 100 мкл среды DPBS, содержащей 1.6, 3.2, 6.4 и 12.8 мг Мβ-ЦД. К контрольной аликвоте добавляли 100 мкл 2%-го раствора Triton X-100 в DPBS. Инкубировали образцы при 37°C в течение 1 ч и определяли концентрацию холестерина в образцах при помощи ферментативного колориметрического детектирования.

**Приготовление комплексов «циклодекстрины—холестерин».** Мβ-ЦД-Х были приготовлены согласно работе [24]. Растворяли 1 г Мβ-ЦД в 2 мл метанола и 200 мг холестерина — в 1 мл хлороформа. Затем 450 мкл раствора холестерина добавляли к раствору Мβ-ЦД, тщательно перемешивали и высушивали на ротационном испарителе Laborota-4000 (Heidolph, Германия).

**Оценка насыщенности мембраны сперматозоидов холестерином.** К 1 мл нативного эякулята добавляли 0, 2, 4, 8 или 16 мг Мβ-ЦД-Х и инкубировали в течение 15 мин при 25°C. После чего к образцу добавляли среду DPBS в соотношении 1 : 2 (об./об.) и центрифугировали при 300 g в течение 10 минут. Полученный осадок ресуспендировали в 2 мл среды DPBS и повторно центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Отбирали супернатант, добавляли к осадку 100 мкл DPBS. Определяли концентрацию сперматозоидов в образце (подсчет производили на менее трех раз, рассчитывали среднее значение) и отбирали 100 мкл для определения концентрации холестерина в образце с помощью ферментативного колориметрического детектирования.

**Определение концентрации холестерина с помощью ферментативно-колориметрического метода.** К 100 мкл исследуемого образца добавляли 100 мкл 2%-го раствора Triton X-100 в DPBS, инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Этот этап пропускали в случае, когда для экстракции холестерина к образцу добавляли Мβ-ЦД-Х. Добавляли к образцу 2 мл ферментно-хромогенной смеси «Холестерин-ФКД». Образцы тщательно перемешивали на вортексе и инкубировали в течение 25 мин при 25°C в темноте. По окончании инкубации сперматозоиды осаждали посредством центрифугирования при 500 g в течение 10 мин. Супернатант отбирали для регистрации спектра поглощения на спектрофотометре ПЭ-5400УФ

(«ЭКРОСХИМ», Россия) в диапазоне длин волн от 300 до 700 нм с шагом 1 нм в кюветах с длиной оптического пути 10 мм. Расчет концентрации холестерина в анализируемом образце проводили по формуле:

$$C = \frac{E_0}{E_K} \cdot \frac{51.7}{n}, \quad (1)$$

где  $C$  — концентрация холестерина в исследуемом образце, нмоль/млн;  $E_0$  — оптическая плотность опытной пробы при длине волны 514 нм, ед. опт. плотн.;  $E_K$  — оптическая плотность калибровочной пробы при длине волны 514 нм, ед. опт. плотн.; 51.7 — количество холестерина в калибровочной пробе, нмоль;  $n$  — количество сперматозоидов в образце, млн.

**Определение оптимальной концентрации Мβ-ЦД-Х для повышения криотолерантности сперматозоидов при криоконсервации.** Нативный эякулят делили на аликвоты объемом 200 мкл, к аликвотам добавляли 50 мкл среды Sperm Wash, содержащей 0 (контроль), 0.25, 0.5 и 1 мг Мβ-ЦД-Х, и инкубировали полученные образцы в течение 15 мин при 25°C. Медленно, по 1 капле в 3–4 с, перемешивая на вортексе, добавляли к образцам криопротекторную среду Sperm Freeze в соотношении 1 : 0.7 (об./об.), инкубировали 10 мин при 25°C. Заморозку осуществляли в устройстве Nandi-freezer Freezing tray (Taylor-Wharton, США) путем трехэтапного ступенчатого охлаждения в течение 45 мин. Образцы спермы хранили в жидком азоте при –196°C. Образцы размораживали на водяной бане при температуре 37°C в течение 5 мин. Непосредственно после разморозки образцов производили оценку подвижности сперматозоидов и доли сперматозоидов с интактной мембраной.

В данной работе показатели подвижности после разморозки выражали через индекс подвижности:

$$I_{\text{motility}} = \frac{P_{\text{postthaw}}}{P_{\text{prefreeze}}} \cdot 100\%, \quad (2)$$

где  $I_{\text{motility}}$  — индекс подвижности,  $P_{\text{postthaw}}$  — доля сперматозоидов с категориями подвижности а и b после разморозки,  $P_{\text{prefreeze}}$  — доля сперматозоидов с категориями подвижности а и b до криоконсервации (в нативном образце).

Процентную долю сперматозоидов с интактной мембраной после разморозки выражали через индекс «жизнеспособности»:

$$I_{\text{viability}} = \frac{V_{\text{postthaw}}}{V_{\text{prefreeze}}} \cdot 100\%, \quad (3)$$

где  $I_{\text{viability}}$  — индекс «жизнеспособности»,  $V_{\text{postthaw}}$  — доля сперматозоидов с интактной мем-

браной после разморозки,  $V_{\text{prefreeze}}$  — доля сперматозоидов с интактной мембраной до криоконсервации (в нативном образце).

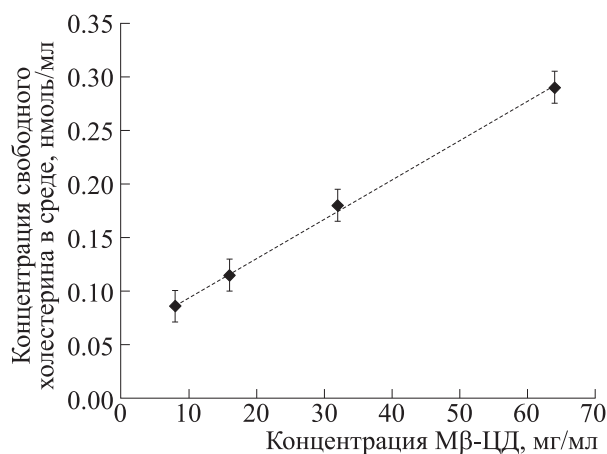
**Рентгеноструктурный анализ.** К 1 мл среды Sperm Wash добавляли 2, 4 и 8 мг Мβ-ЦД или 2, 4 и 8 мг Мβ-ЦД-Х. Затем к образцам добавляли криопротекторную среду Sperm freeze и замораживали в соответствии с вышеописанным протоколом. Дифракционные картины для исследуемых растворов были получены на пучке P11 синхротронного источника PETRA III в Исследовательском центре DESY (Гамбург, Германия).

**Статистическая обработка.** При оценке цитотоксичности циклодекстринов расчет доли сперматозоидов с интактной мембраной проводили целиком по всей группе, для сравнения этих данных применяли критерий хи-квадрат Пирсона ( $\chi^2$ ). Для описания количественных признаков (индекс подвижности и индекс «жизнеспособности») были использованы медианные значения ( $Me$ ) и межквартильный интервал. Для сравнения медианных значений индекса подвижности и индекса «жизнеспособности» применяли  $W$ -критерия Уилкоксона. В качестве меры статистической связи между концентрацией сперматозоидов в образцах эякулята и индексом «жизнеспособности» после разморозки при добавлении различных концентраций Мβ-ЦД-Х использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для описания концентрации холестерина в образцах были использованы среднее значение ( $M$ ) и стандартное отклонение ( $\pm SD$ ). Для всех используемых критериев уровень статистической значимости различий был определен как  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Взаимодействие Мβ-ЦД и Мβ-ЦД-Х с мембраной сперматозоидов; цитотоксичность.** Была исследована цитотоксичность Мβ-ЦД и комплексов Мβ-ЦД-Х по отношению к сперматозоидам человека. Сперматозоиды инкубировали с Мβ-ЦД в диапазоне концентрации от 2 до 128 мг/мл или Мβ-ЦД-Х в диапазоне концентраций от 2 до 32 мг/мл, долю клеток с интактной мембраной оценивали через 15, 30 и 60 минут инкубации.

Было установлено, что Мβ-ЦД обладают выраженной цитотоксичностью по отношению к сперматозоидам человека. Для концентрации Мβ-ЦД, равной 2 мг/мл, различия в доле клеток с интактной мембраной между образцами, содержащими Мβ-ЦД, и контролем становились статистически значимыми через 30 мин инкубации, а для концентраций  $\geq 4$  мг/мл — через 15 мин инкубации. Для времени инкубации 15 мин средняя токсическая концентрация Мβ-ЦД, вызывающая гибель 50% клеток ( $IC_{50}$ ), для сперматозоидов человека составила 32 мг/мл (табл. 1).



**Рис. 2.** График зависимости концентрации свободного холестерина в среде со сперматозоидами от концентрации Мβ-ЦД в образце ( $R^2 = 0.9987$ ). Данные представлены в виде среднего значения ( $M$ )  $\pm$  стандартное отклонение ( $SD$ ) ( $n = 5$ ).

Цитотоксичность Мβ-ЦД может быть обусловлена их способностью экстрагировать липидные компоненты клеточной мембраны, в частности холестерин, образуя с ними комплексы включения [42, 43].

В данной работе была измерена концентрация холестерина в среде, в которой инкубировались сперматозоиды после добавления различных концентраций Мβ-ЦД. С увеличением концентрации Мβ-ЦД в образце концентрация холестерина в среде возрастала (рис. 2). Инкубация сперматозоидов в течение часа при 37°C в среде, содержащей 8, 16, 32 и 64 мг/мл Мβ-ЦД, привела к экстракции соответственно 20, 27, 42 и 67% холестерина из мембран сперматозоидов.

Для Мβ-ЦД-Х различие в доле клеток с интактной мембраной между контролем и образцами, содержащими Мβ-ЦД-Х, становилось статистически значимым при концентрации Мβ-ЦД-Х, равной 16 мг/мл, через 1 ч инкубации. Однако доля сперматозоидов с интактной мембраной в этих образцах была значительно выше, чем в образцах, инкубированных с такой же концентрацией Мβ-ЦД. Менее выраженная цитотоксичность эквивалентных концентраций Мβ-ЦД-Х, полости которых заполнены холестерином, косвенно подтверждает тот факт, что цитотоксичность Мβ-ЦД обусловлена их аффинностью к липидам мембраны.

В работах [44] и [45] исследовалась цитотоксичность циклодекстринов по отношению к эндотелиальным клеткам пупочной вены человека и клеткам колоректальной аденокарциномы человека Сасо 2. Авторы пришли к заключению, что выраженность цитотоксического эффекта определяется холестеринсолубилизирующей способ-

**Таблица 1.** Доля сперматозоидов с интактной мембраной в образцах инкубированных с различными концентрациями Мβ-ЦД и Мβ-ЦД-Х в течение 15, 30 и 60 минут

	Концентрация							
	2 мг/мл	4 мг/мл	8 мг/мл	16 мг/мл	32 мг/мл	64 мг/мл	128мг/мл	контроль
15 минут								
Мβ-ЦД	1376/1400 98.3% $p = 0.672$	1373/1400 98.1% $p = 1$	1236/1400 88.3% $p < 0.01$	910/1400 65.0% $p < 0.01$	609/1400 43.5% $p < 0.01$	567/1400 40.5% $p < 0.01$	22/1400 1.6% $p < 0.01$	1373/1400 98.1%
30 минут								
Мβ-ЦД	1292/1400 92.3% $p < 0.01$	1276/1400 91.2% $p < 0.01$	1190/1400 85.0% $p < 0.01$	791/1400 56.5% $p < 0.01$	607/1400 43.4% $p < 0.01$	529/1400 37.8% $p < 0.01$	14/1400 1.0% $p < 0.01$	1369/1400 97.8%
Мβ-ЦД-Х	1379/1400 98.5% $p = 0.162$	1376/1400 98.3% $p = 0.341$	1380/1400 98.6% $p = 0.121$	1370/1400 97.9% $p = 0.897$	1325/1400 94.7% $p < 0.01$	—	—	
60 минут								
Мβ-ЦД	1254/1400 89.6% $p < 0.01$	1240/1400 88.6% $p < 0.01$	1029/1400 73.5% $p < 0.01$	732/1400 52.3% $p < 0.01$	553/1400 39.5% $p < 0.01$	336/1400 24.0% $p < 0.01$	0	1370/1400 97.9%
Мβ-ЦД-Х	1380/1400 98.6% $p = 0.154$	1377/1400 98.4% $p = 0.332$	1355/1400 96.8% $p = 0.080$	1253/1400 89.5% $p < 0.01$	1195/1400 85.4% $p < 0.01$	—	—	

Примечание. Для сравнения данных использован критерий хи-квадрат ( $\chi^2$ ). Уровень статистической значимости различий определен как  $p < 0.05$ .

ностью конкретного производного циклодекстринов, которая, в свою очередь, зависит от вида заместителя, степени замещенности гидроксильных групп и положения заместителя [46–48]. Способность метилированных производных циклодекстринов образовывать водорастворимые комплексы включения с холестерином возрастает с увеличением количества метильных групп в молекуле циклодекстрина, достигая максимального значения (в среднем 3.8 мг холестерина на 1 мл раствора, содержащего 0.04 М циклодекстринов) при количестве метильных заместителей, равном 14 (соответствует диметил-β-циклодекстрину (DIMEB), у которого на каждый остаток глюкозы молекулы циклодекстрина приходится по 2 метильные группы) [45].

Мβ-ЦД, изучаемые в данной работе, относятся к произвольно метилированным производным (RAMEB) и содержат 1.5–2.1 метильных групп на каждый остаток глюкозы молекулы Мβ-ЦД. РА-

МЕВ-производные обладают высокой холестеринсолюбилизирующей способностью: по эффективности включения холестерина они стоят на втором месте после DIMEB-производных Мβ-ЦД [47], что обуславливает их выраженную цитотоксичность.

Встраивание или экстракция липидов плазматической мембраны может приводить к изменению формы клеток вследствие изменения соотношения площадей наружного и внутреннего монослоев мембраны [49]. Такие изменения возможны и в случае экстракции и включения в мембрану молекул холестерина [50]. Инкубация сперматозоидов с Мβ-ЦД приводит к изменению морфологии сперматозоидов: хвосты сперматозоидов закручиваются. Данный эффект наблюдался при концентрации Мβ-ЦД в образце, равной 16 мг/мл, и становился более выраженным при дальнейшем (32 мг/ и выше) повышении концентрации Мβ-ЦД (рис. 3).

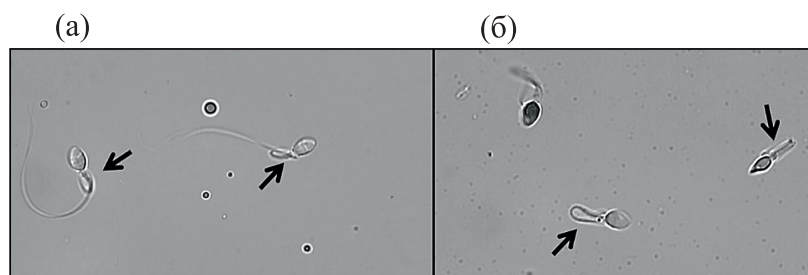


Рис. 3. Изменение морфологии сперматозоидов при добавлении к образцу: (а) – 16 мг/мл Мβ-ЦД, (б) – 32 мг/мл Мβ-ЦД. Стрелка указывает на характерное закручивание хвоста сперматозоидов.

**Насыщение мембраны сперматозоидов холестерином с помощью Мβ-ЦД-Х.** Была определена концентрация холестерина в мембранах сперматозоидов после инкубации нативного эякулята с различными концентрациями Мβ-ЦД-Х (рис. 4). В области концентраций Мβ-ЦД-Х  $\leq 8$  мг/мл зависимость концентрации холестерина в образце от концентрации Мβ-ЦД-Х выражается полиномом второго порядка ( $R^2 = 0.9847$ ). Аналогичный вид зависимости наблюдался в работах по насыщению холестерином мембран сперматозоидов жеребцов [51] и быков [52]. При концентрации Мβ-ЦД-Х  $> 8$  мг/мл кривая зависимости выходит на плато.

Инкубация сперматозоидов с 2, 4, 8 и 16 мг/мл Мβ-ЦД-Х приводит к повышению концентрации холестерина в образце в среднем в 2.4, 3.13, 5.8 и 6.0 раз. Встраивание такого количества холестерина в мембраны сперматозоидов привело бы к соотношению холестерин/фосфолипиды в мембране, равному  $\sim 2.4, 3.13, 5.8$  и  $6$  соответственно.

Максимальное количество холестерина, которое может встроиться в липидный бислой, со-

ставляет 50 моль % (молярное соотношение холестерин/фосфолипиды равно 1). При более высоком молярном соотношении холестерин/фосфолипиды ( $> 50$  моль % холестерина) в пределах упорядоченной жидкокристаллической фазы  $L_o$  бислоя образуются домены чистого холестерина. Дальнейший рост концентрации холестерина в бислое ( $> 66$  моль % холестерина, молярное соотношение холестерин/фосфолипиды равно 2) приводит к образованию кристаллов холестерина, предположительно вне липидного бислоя [53].

Таким образом, измеренное количество холестерина в образцах не может состоять только из холестерина мембран сперматозоидов. Предположительно, часть комплексов Мβ-ЦД-Х остаются в среде, содержащей сперматозоиды после отмычки, внося вклад в повышение концентрации холестерина в образце. Оценка остаточного количества комплексов Мβ-ЦД-Х в среде после двукратной отмычки показала, что для концентрации Мβ-ЦД-Х, равной 4 мг/мл, оно составляет

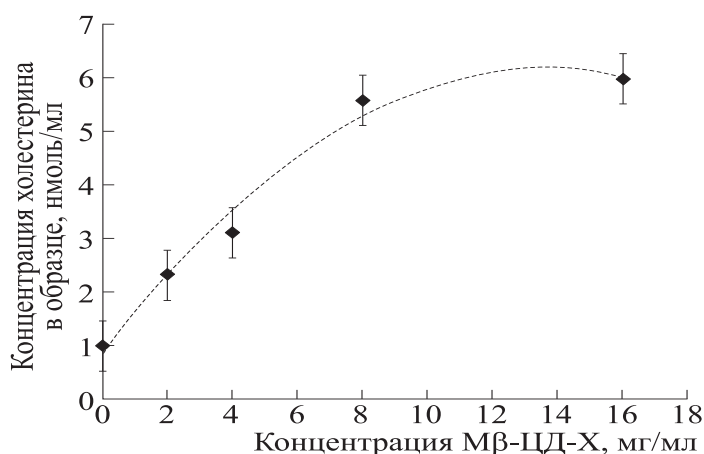
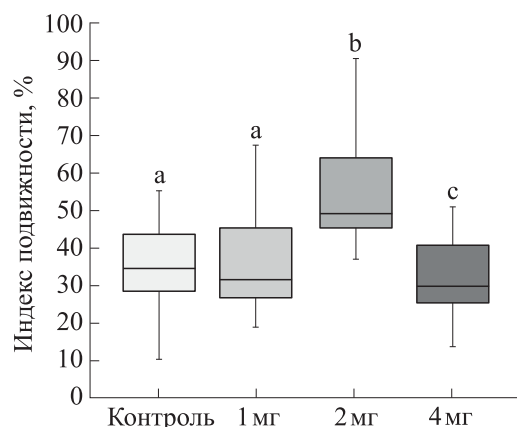
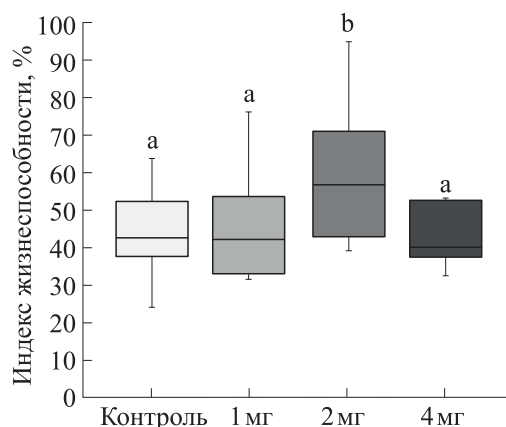


Рис. 4. График зависимости концентрации холестерина в образце, содержащем сперматозоиды, от концентрации Мβ-ЦД-Х, добавленных к эякуляту ( $R^2 = 0.9847$ ). Данные представлены в виде среднего значения ( $M$ )  $\pm$  стандартное отклонение ( $SD$ ) ( $n = 5$ ).





**Рис. 5.** Box-plot-диаграмма индекса подвижности сперматозоидов после разморозки в образцах, инкубированных с 1, 2 и 4 мг/мл Мβ-ЦД-X перед криоконсервацией, и в контрольных образцах ( $n = 12$ ). Для сравнения данных использован  $W$ -критерий Уилкоксона. Уровень статистической значимости определен как  $p < 0.05$ . Буквами *a*, *b* и *c* обозначены статистически значимо отличные выборки. Выборки с одинаковым буквенным индексом не имеют статистически значимых различий.



**Рис. 6.** Box-plot-диаграмма индекса «жизнеспособности» сперматозоидов после разморозки в образцах, инкубированных с 1, 2 и 4 мг/мл Мβ-ЦД-X перед криоконсервацией, и в контрольных образцах ( $n = 12$ ). Для сравнения данных использован  $W$ -критерий Уилкоксона. Уровень статистической значимости определен как  $p < 0.05$ . Буквами *a* и *b* обозначены статистически значимо отличные выборки. Выборки с одинаковым буквенным индексом не имеют статистически значимых различий.

менее 10% от среднего значения концентрации холестерина в образцах.

Вероятно, Мβ-ЦД-X могут адсорбироваться на поверхности клеточной мембраны сперматозоидов. Данные, полученные с использованием малоуглового рассеяния, показали, что при добавлении к липосомам Мβ-ЦД склонны адсорбироваться на их поверхности [54]. Можно предположить, что и Мβ-ЦД-X с холестерином будут взаимодействовать с мембраной схожим образом. В таком случае содержание холестерина в образцах повышается за счет холестерина, который встраивается в бислой, и в большей степени за счет холестерина, присутствующего в составе Мβ-ЦД-X на поверхности клеток.

**Определение оптимальной концентрации Мβ-ЦД-X для криоконсервации сперматозоидов человека.** Было исследовано влияние инкубации эякулята с различными концентрациями Мβ-ЦД-X перед заморозкой на выживаемость сперматозоидов (рис. 5 и 6). После разморозки во всех образцах наблюдалось значительное снижение подвижности и доли сперматозоидов с интактной мембраной по сравнению с нативными образцами. Индекс подвижности и индекс «жизнеспособности» после разморозки были статистически значимо выше для образцов, инкубированных с 2 мг/мл Мβ-ЦД-X перед криоконсервацией, чем в контрольных образцах (49.4 [45.3; 64.3] vs. 34.6 [28.5; 43.9],  $p < 0.05$ ; 56.6 [42.9; 70.9] vs. 42.8 [37.4; 52.1],  $p < 0.05$ ). Статистически значимые различия между индексом подвижности и индексом «жизнеспособности» в образцах, инкубиро-

ванных перед криоконсервацией с 1 мг/мл Мβ-ЦД-X, и соответствующими параметрами в контрольных образцах обнаружены не были (31.8 [26.7; 45.8] vs. 34.6 [28.5; 43.9],  $p = 1$ ; 42.0 [33.1; 53.4] vs. 42.8 [37.4; 52.1],  $p = 0.76$ ). В образцах, инкубированных с 4 мг/мл Мβ-ЦД-X перед криоконсервацией, индекс подвижности был статистически значимо ниже, чем в контрольных образцах (29.6 [25.3; 40.8] vs. 34.6 [28.5; 43.9],  $p < 0.05$ ). При этом индекс «жизнеспособности» в этих образцах статистически значимо не отличался от контроля (39.8 [37.7; 51.3] vs. 42.8 [37.4; 52.1],  $p = 0.81$ ).

Аналогичные результаты были получены для других видов млекопитающих: инкубация с Мβ-ЦД-X с концентрацией 2 мг на 120 млн клеток перед криоконсервацией повышала выживаемость сперматозоидов быка [52] и барана [55]. Для жеребца концентрация Мβ-ЦД-X, повышающая криотолерантность сперматозоидов, составляла 1.5 мг на 120 млн клеток [51, 56, 57].

В данной работе концентрацию добавленных к эякуляту Мβ-ЦД-X рассчитывали на объем эякулята, а не на количество клеток, как это представлено в большинстве статей, для удобства дальнейшей рутинной работы в случае внедрения Мβ-ЦД-X в качестве компонента криопротекторной среды в клиническую практику. Медианное значение концентрации сперматозоидов в образцах составило 100.5 [78.0; 109.5] млн/мл. Мы не выявили корреляции между концентрацией сперматозоидов в нативном образце и выживаемостью сперматозоидов после разморозки при инкуба-



**Таблица 2.** Средний размер кристаллов, формирующихся в образцах с различной концентрацией Мβ-ЦД и Мβ-ЦД-Х

Контроль	2 мг Мβ-ЦД	4 мг Мβ-ЦД	8 мг Мβ-ЦД	2 мг Мβ-ЦД-Х	4 мг Мβ-ЦД-Х	8 мг Мβ-ЦД-Х
14 мкм	15 мкм	14 мкм	14 мкм	15 мкм	15 мкм	14 мкм

Примечание. Состав криопротекторного раствора — 1 мл среды Sperm Wash + 0.7 мл среды Sperm Freeze. Для каждого образца оценка среднего размера кристаллов проводилась по 2000 значений.

ции эякулята с различными концентрациями Мβ-ЦД-Х перед криоконсервацией. Для концентраций Мβ-ЦД-Х, равных 1 и 2 мг/мл, коэффициент ранговой корреляции Спирмена составил 0.059 ( $p = 0.89$ ) и 0.275 ( $p = 0.51$ ) соответственно.

**Анализ кристаллообразования в криопротекторной среде Sperm Freeze после добавления Мβ-ЦД и Мβ-ЦД-Х методом рентгеноструктурного анализа.** Дисахариды (сахароза, трегалоза) широко используются в криобиологии в качестве непроницающих криопротекторов [58]. Ингибирование роста кристаллов льда дисахаридами обусловлено как уменьшением количества свободной воды в растворе за счет значительного гидратационного эффекта, так и увеличением частоты нуклеации кристаллов льда [59]. Таким образом, включение дисахаридов в криопротекторный раствор приводит к уменьшению размера кристаллов льда, при этом увеличивая их количество [60, 61]. Можно предположить, что циклодекстрины, являясь олигомерами глюкозы, также могут влиять на структуру окружающей воды и образование льда. Рентгеноструктурный анализ сформировавшихся в процессе криоконсервации кристаллов льда в образцах с добавлением 2, 4 и 8 мг/мл Мβ-ЦД или Мβ-ЦД-Х показал, что средний размер образующихся кристаллов не отличается от среднего размера кристаллов в контрольных образцах (табл. 2). Исходя из этого, можно сделать вывод, что криопротекторный механизм циклодекстринов и комплексов включения на их основе заключается не в подавлении роста кристаллов льда, по крайней мере для используемых в работе концентраций. Криопротекторный механизм Мβ-ЦД-Х, по-видимому, носит комплексный характер. Он обусловлен как непосредственно встраиванием холестерина в бислой мембраны, так и ассоциацией Мβ-ЦД-Х с поверхностью мембраны клеток. Встраиваясь в мембрану сперматозоидов, холестерин влияет на физико-химические свойства бислоя и фазово-структурные переходы липидов мембраны. Наслаиваясь на поверхности клеток, Мβ-ЦД-Х, вероятно, способствуют замедлению осмотического и диффузионного обмена между клеткой и внешней средой, что позволяет снизить осмотический стресс. Конкрет-

ный механизм криозащитных свойств Мβ-ЦД-Х еще предстоит выяснить.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Произвольно метилированные производные бета-циклодекстринов обладают выраженной цитотоксичностью по отношению к сперматозоидам человека, что обусловлено высокой холестерин-солюбилизирующей способностью данных производных циклодекстринов. Инкубация сперматозоидов с Мβ-ЦД приводит к экстракции значительного количества холестерина (67% для концентрации Мβ-ЦД в образце, равной 64 мг/мл) из мембран клеток и, как следствие, к изменению их морфологии, потере подвижности и гибели клеток. Цитотоксичность Мβ-ЦД-Х значительно менее выражена, так как они не могут экстрагировать липидные компоненты мембраны клеток из-за того, что их полости уже заполнены холестерином. В концентрациях, используемых для повышения криотолерантности сперматозоидов, Мβ-ЦД-Х не цитотоксичны.

При инкубации сперматозоидов с Мβ-ЦД-Х (2–16 мг/мл) количество холестерина в образце со сперматозоидами возрастает. Измеренное количество холестерина в образцах превышает теоретически возможное его содержание в мембране в несколько раз. Вероятно, это объясняется адсорбцией Мβ-ЦД-Х на поверхности мембран сперматозоидов, приводящей к существенному увеличению количества холестерина в образцах.

Инкубация сперматозоидов с 2 мг/мл Мβ-ЦД-Х перед криоконсервацией приводит к увеличению индекса подвижности и индекса «жизнеспособности» сперматозоидов после разморозки на 14.8 и 13.8% соответственно. Инкубация сперматозоидов с 1 и 4 мг/мл Мβ-ЦД-Х не приводит к статистически значимому повышению криотолерантности сперматозоидов.

Рентгеноструктурный анализ среднего размера кристаллов льда, образующихся в образцах при криоконсервации, не выявил статистически значимых различий между образцами с добавлением Мβ-ЦД и Мβ-ЦД-Х и контрольными образцами.

Таким образом, криопротекторный механизм Мβ-ЦД-Х, по-видимому, представляет собой совокупность двух факторов: 1) изменение физико-химических свойств мембраны в результате изменения концентрации холестерина в бислое; 2) смягчение осмотических эффектов в результате адсорбции Мβ-ЦД-Х на поверхности мембраны.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good clinical practice) и принципами Хельсинской Декларации. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом клиники репродукции человека «Альтравита» (ООО «ЭКО ЦЕНТР»). До включения в исследование у всех участников было получено письменное информированное согласие.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Royere D., Barthelemy C., Hamamah S., and Lansac J. Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. *Hum. Reprod. Update*, **2**, 553–559 (1996). DOI: 10.1093/HUMUPD/2.6.553
- Polge C., Smith A. U., and Parkes A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, **164**, 666–666 (1949). DOI: 10.1038/164666a0
- Bunge R. G. and Sherman J. K. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature*, **172**, 767–768 (1953). DOI: 10.1038/172767b0
- Rodriguez-Wallberg K. A., Waterstone M., and Anastácio A. Ice age: Cryopreservation in assisted reproduction - An update. *Reprod. Biol.*, **19**, 119–126 (2019). DOI: 10.1016/J.REPBIO.2019.04.002
- McBride A. J. and Lipshultz L. I. Male fertility preservation. *Curr. Urology Rep.*, **19** (7), 49 (2018). DOI: 10.1007/s11934-018-0803-2
- Moore K. J., Delgado C., and Ory J. Fertility preservation in uro-oncology. *Curr. Opin. Support Palliat. Care*, **16**, 230–233 (2022). DOI: 10.1097/SPC.0000000000000621
- Hughes G. and da Silva M. S. Sperm cryopreservation for impaired spermatogenesis. *Reproduction & fertility*, **4** (1), e220106 (2022). Advance online publication. DOI: 10.1530/RAF-22-0106
- Liu S. and Li F. Cryopreservation of single-sperm: where are we today? *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **18** (1), 41 (2020). DOI: 10.1186/S12958-020-00607-X
- Guidance regarding gamete and embryo donation (American Society for Reproductive Medicine, 2021).
- Ozimic S., Ban-Frangez H., and Stimpfel M. Sperm cryopreservation today: approaches, efficiency, and pitfalls. *Curr. Issues Mol. Biol.*, **45**, 4716–4734 (2023). DOI: 10.3390/CIMB45060300
- Kunkitti P., Chatdarong K., Suwimonteerabutr J., Neddumpun T., Johannisson A., Bergqvist A. S., Sjunnesson Y., and Axné E. Osmotic tolerance of feline epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, **185**, 148–153 (2017). DOI: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2017.08.014
- Yashaswi S. and Mona S. Biophysics of cryopreservation. *Int. J. Thermodynamics*, **25**, 17–27 (2022). DOI: 10.5541/IJOT.925283
- Morris J. G., Acton E., Murray B. J., and Fonseca F. Freezing injury: the special case of the sperm cell. *Cryobiology*, **64**, 71–80 (2012). DOI: 10.1016/J.CRYOBIOL.2011.12.002
- Белоус А. М. и Грищенко В. И. Криобиология (Наукова думка, 1994).
- Quinn P. J. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiology*, **22**, 128–146 (1985). DOI: 10.1016/0011-2240(85)90167-1
- Ilieva A., Ivanov A. G., Kovachev K., Richter H. P. Cryo-damage in ram sperm plasma membranes. Energy transfer and freeze-fracture studies. *J. Electroanal. Chem.*, **342**, 41–44 (1992). DOI: 10.1016/0022-0728(92)85033-Y
- Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.*, **247** (3), 125–142 (1984). DOI: 10.1152/AJPCELL.1984.247.3.C125
- van Blitterswijk W. J., Hilkman H., and van der Meer B. W. Quantitative contributions of cholesterol and the individual classes of phospholipids and their degree of fatty acyl (un)saturation to membrane fluidity measured by fluorescence polarization. *Biochemistry*, **26**, 1746–1756 (1987). DOI: 10.1021/BI00380A038
- Yeagle P. L. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, **822**, 267–287 (1985). DOI: 10.1016/0304-4157(85)90011-5
- Tilcock C. P. S., Bally M. B., Farren S. B., Cullis P. R., and Gruner S. M. Cation-dependent segregation phenomena and phase behavior in model membrane systems containing phosphatidylserine: influence of cholesterol and acyl chain composition. *Biochemistry*, **23**, 2696–2703 (1984). DOI: 10.1021/BI00307A025
- Cohen R., Mukai C., and Travis A. J. Lipid regulation of acrosome exocytosis. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, **220**, 107–127 (2016). DOI: 10.1007/978-3-319-30567-7\_6
- Abou-haila A. and Tulsiani D. R. P. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Arch. Biochem. Biophys.*, **485**, 72–81 (2009). DOI: 10.1016/J.ABB.2009.02.003
- Darin-Bennett A. and White I. G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, **14**, 466–470 (1977). DOI: 10.1016/0011-2240(77)90008-6
- Purdy P. H. and Graham J. K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, **48**, 36–45 (2004). DOI: 10.1016/j.cryobiol.2003.12.001
- Mocé E. and Graham J. K. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosur-

- vival. *J. Anim. Sci.*, **84**, 826–833 (2006). DOI: 10.2527/2006.844826X
26. Combes G. B., Varner D. D., Schroeder F., Burghardt R. C., and Blanchard T. L. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **56**, 127–132 (2000). PMID: 20681124
  27. Moore A. I., Squires E. L., and Graham J. K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, **51**, 241–249 (2005). DOI: 10.1016/J.CRYOBIOL.2005.07.004
  28. Uekama K., Hirayama F., and Irie T. Cyclodextrin drug carrier systems. *Chem. Rev.*, **98**, 2045–2076 (1998). DOI: 10.1021/CR970025P
  29. Huang Z. and London E. Effect of cyclodextrin and membrane lipid structure upon cyclodextrin-lipid interaction. *Langmuir*, **29**, 14631–14638 (2013). DOI: 10.1021/LA4031427
  30. Lipkowitz K. B. Applications of computational chemistry to the study of cyclodextrins. *Chem. Rev.*, **98**, 1829–1873 (1998). DOI: 10.1021/CR9700179
  31. Davis M. E. and Brewster M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **3**, 1023–1035 (2004). DOI: 10.1038/NRD1576
  32. Szente L. and Fenyvesi É. Cyclodextrin-lipid complexes: cavity size matters. *Struct. Chem.*, **28**, 479–492 (2017). DOI: 10.1007/S11224-016-0884-9/METRICS
  33. Ohtani Y., Irie T., Uekama K., Fukunaga K., and Pitha J. Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.*, **186**, 17–22 (1989). DOI: 10.1111/J.1432-1033.1989.TB15171.X
  34. Tsamaloukas A., Szadkowska H., Slotte P. J., and Heerklotz H. Interactions of cholesterol with lipid membranes and cyclodextrin characterized by calorimetry. *Biophys. J.*, **89**, 1109–1119 (2005). DOI: 10.1529/BIOPHYSJ.105.061846
  35. Christoforides E., Papaioannou A., and Bethanis K. Crystal structure of the inclusion complex of cholesterol in  $\beta$ -cyclodextrin and molecular dynamics studies. *Beilstein J. Org. Chem.*, **14**, 838–848 (2018). DOI: 10.3762/BJOC.14.69
  36. Jozwiakowski M. J. and Connors K. A. Aqueous solubility behavior of three cyclodextrins. *Carbohydr. Res.*, **143**, 51–59 (1985). DOI: 10.1016/S0008-6215(00)90694-3
  37. Szente L. and Szejtli J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **36**, 17–28 (1999). DOI: 10.1016/S0169-409X(98)00092-1
  38. Szejtli J. Dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin as parenteral drug carrier. *J. Inclusion Phenomena*, **1**, 135–150 (1983). DOI: 10.1007/BF00656816
  39. Spencer C. M., Stoddart J. F., and Zarzycki R. Structural mapping of an unsymmetrical chemically modified cyclodextrin by high-field nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, No 9, 1323–1336 (1987). DOI: 10.1039/P29870001323
  40. Process for the preparation of alkylated cyclodextrin derivatives, methylated cyclodextrin derivatives which can be prepared by the process and the use of the products. Patent № DE4333598A1
  41. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. *World Health Organization*, **6**, 1–276 (2021)
  42. Christian A. E., Haynes M. P., Phillips M. C., and Rothblat G. H. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J. Lipid Res.*, **38**, 2264–2272 (1997). DOI: 10.1016/S0022-2275(20)34940-3
  43. Kilsdonk E. P. C., Yancey P. G., Stoudt G. W., Bangerter F. W., Johnson W. J., Phillips M. C., and Rothblat G. H. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J. Biol. Chem.*, **270**, 17250–17256 (1995). DOI: 10.1074/JBC.270.29.17250
  44. Castagne D., Fillet M., Delattre L., Evrard B., Nussgens B., and Piel G. Study of the cholesterol extraction capacity of  $\beta$ -cyclodextrin and its derivatives, relationships with their effects on endothelial cell viability and on membrane models. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **63**, 225–231 (2009). DOI: 10.1007/S10847-008-9510-9/METRICS
  45. Kiss T., Fenyvesi F., Bácskay I., Váradi J., Fenyvesi É., Iványi R., Szente L., Tótsaki Á., and Vecsernyés M. Evaluation of the cytotoxicity of beta-cyclodextrin derivatives: evidence for the role of cholesterol extraction. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **40**, 376–380 (2010). DOI: 10.1016/J.EJPS.2010.04.014
  46. Piel G., Piette M., Barillaro V., Castagne D., Evrard B., and Delattre L. Study of the relationship between lipid binding properties of cyclodextrins and their effect on the integrity of liposomes. *Int. J. Pharm.*, **338**, 35–42 (2007). DOI: 10.1016/J.IJPHARM.2007.01.015
  47. Wenz G. Influence of intramolecular hydrogen bonds on the binding potential of methylated  $\beta$ -cyclodextrin derivatives. *Beilstein J. Org. Chem.*, **8**, 1890–1895 (2012). DOI: 10.3762/BJOC.8.218
  48. Fenyvesi É., Szemán J., Csabai K., Malanga M., and Szente L. Methyl-beta-cyclodextrins: the role of number and types of substituents in solubilizing power. *J. Pharm. Sci.*, **103**, 1443–1452 (2014). DOI: 10.1002/JPS.23917
  49. Sheetz M. P. and Singer S. J. Equilibrium and kinetic effects of drugs on the shapes of human erythrocytes. *J. Cell Biol.*, **70**, 247–251 (1976). DOI: 10.1083/JCB.70.1.247
  50. Cassera M. B., Silber A. M., and Gennaro A. M. Differential effects of cholesterol on acyl chain order in erythrocyte membranes as a function of depth from the surface. An electron paramagnetic resonance (EPR) spin label study. *Biophys. Chem.*, **99**, 117–127 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(02\)00139-4](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(02)00139-4)
  51. Moore A. I., Squires E. L., and Graham J. K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, **51**, 241–249 (2005). <https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2005.07.004>
  52. Mocé E. and Graham J. K. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosur-



- vival. *J. Anim. Sci.*, **84**, 826–833 (2006).  
DOI: 10.2527/2006.844826X
53. Subczynski W. K., Pasenkiewicz-Gierula M., Widomska J., Mainali L., and Raguz M. High cholesterol/low cholesterol: Effects in biological membranes: a review. *Cell Biochem. Biophys.*, **75**, 369–385 (2017).  
DOI: 10.1007/S12013-017-0792-7
  54. Joset A., Grammenos A., Hoebeke M., and Leyh B. Investigation of the interaction between a  $\beta$ -cyclodextrin and DMPC liposomes: A small angle neutron scattering study. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **83**, 227–238 (2015). DOI: 10.1007/S10847-015-0558-Z/METRICS
  55. Mocé E., Purdy P. H., and Graham J. K. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Anim. Reprod. Sci.*, **118**, 236–247 (2010).  
DOI: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2009.06.013
  56. Murphy C., English A. M., Holden S. A., and Fair S. Cholesterol-loaded-cyclodextrins improve the post-thaw quality of stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, **145**, 123–129 (2014). DOI: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2014.01.013
  57. Spizziri B. E., Fox M. H., Bruemmer J. E., Squires E. L., and Graham J. K. Cholesterol-loaded-cyclodextrins and fertility potential of stallions spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, **118**, 255–264 (2010).  
DOI: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2009.08.001
  58. da Cardoso L. M. F., Pinto M. A., Pons H. A., and Alves L. A. Cryopreservation of rat hepatocytes with disaccharides for cell therapy. *Cryobiology*, **78**, 15–21 (2017).  
DOI: 10.1016/J.CRYOBIOL.2017.07.010
  59. Uchida T., Nagayama M., Shibayama T., and Gohara K. Morphological investigations of disaccharide molecules for growth inhibition of ice crystals. *J. Crystal Growth*, **299**(1), 125–135 (2007).  
DOI: 10.1016/j.jcrysgro.2006.10.261
  60. Solocinski J., Osgood Q., Wang M., Connolly A., Menze M. A., and Chakraborty N. Effect of trehalose as an additive to dimethyl sulfoxide solutions on ice formation, cellular viability, and metabolism. *Cryobiology*, **75**, 134–143 (2017). DOI: 10.1016/J.CRYOBIOL.2017.01.001
  61. Wang G. M. and Haymet A. D. J. Trehalose and other sugar solutions at low temperature: modulated differential scanning calorimetry (MDSC). *J. Phys. Chemistry B*, **102**, 5341–5347 (1998). DOI: 10.1021/JP980942E

## The Use of Cholesterol/Randomly Methylated $\beta$ -Cyclodextrin (RAMEB) Inclusion Complexes to Improve Human Spermatozoa Cryosurvival

A.G. Mironova\*, \*\*, S.I. Afanasyeva\*\*\*, S.A. Yakovenko\*\*\*,  
A.N. Tikhonov\*\*, \*\*\*, and E.Yu. Simonenko\*\*\*

\*Human Reproduction Clinic “Altravita”, ul. Nagornaya 4A, Moscow, 117186 Russia

\*\*N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

\*\*\*Faculty of Physics, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia

Cryoprotective properties of cholesterol/randomly methylated beta-cyclodextrin (RAMEB) inclusion complexes with respect to human spermatozoa have been investigated. The influence of different concentrations of RAMEB and cholesterol/RAMEB inclusion complexes on sperm membranes has been explored. It was shown that obvious cytotoxicity of RAMEB against spermatozoa is due to the interaction between cyclodextrins and lipid components of the membrane, in particular cholesterol extraction. Cholesterol/RAMEB inclusion complexes are significantly less cytotoxic. The dependence of cholesterol concentration in sperm membranes on the concentration of cholesterol/RAMEB inclusion complexes in the sample was established. It was demonstrated that incubation of spermatozoa with 2 mg/ml of cholesterol inclusion complexes before cryopreservation caused a statistically significant increase in survival rate (by 13.8%) and in the proportion of progressively motile spermatozoa (by 14.8%) post-thaw. X-ray diffraction revealed that the concentrations of RAMEB or cholesterol/RAMEB inclusion complexes (2, 4 and 8 mg/mL) do not affect the average size of ice crystals formed in the sample during cryopreservation in the samples. The mechanism of the cryoprotective effect of cholesterol/RAMEB inclusion complexes is proposed.

**Keywords:** cryopreservation, spermatozoa, membrane, cholesterol methylated beta-cyclodextrin, RAMEB