



<https://doi.org/10.15407/cryo35.04.221>

УДК: 616.697-092.9: 612.014.46:615.384

М.П. Петрушко¹, Т.О. Юрчук^{1, 2}

¹ Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,
м. Харків, Україна

² InLife Інститут розмноження тварин і досліджень харчових продуктів, ПАН,
м. Ольштин, Польща

* petrushkomarina@gmail.com

ГІПОКСІЯ ЯК МОДУЛЮЮЧИЙ ЧИННИК КАПАЦИТАЦІЇ ТА КРІОРЕЗИСТЕНТНОСТІ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ЛЮДИНИ

Попри поглиблений інтерес до ролі гіпоксії у репродуктивних процесах, її вплив на капацитацію та кріорезистентність сперматозоїдів досі недостатньо з'ясовано. У роботі досліджено вплив рівня оксигенації під час інкубації сперматозоїдів перед кріоконсервуванням на ефективність капацитації, а також визначено зв'язок між капацитацією та кріорезистентністю. Відповідно до критеріїв ВООЗ проаналізовано еякуляти 30 здорових чоловіків із нормозооспермією. Оцінено функціональні характеристики та кріорезистентність сперматозоїдів після обробки градієнтом щільності та капацитації в умовах *in vitro* за концентрацій кисню 1, 5 та 21 %. Встановлено, що інкубація сперматозоїдів людини в умовах помірної гіпоксії позитивно впливає на життєздатність, рухливість та активацію капацитації. Вперше показано, що кисневий режим в умовах інкубації *in vitro* є критичним фактором, який визначає рівень виживання сперматозоїдів після розморожування. Отримані результати дають підстави розглядати помірну гіпоксію як перспективну біотехнологічну стратегію для покращення протоколів кріоконсервування сперматозоїдів та підвищення ефективності допоміжних репродуктивних технологій.

Ключові слова: кріоконсервування, гіпоксія, сперматозоїди людини, капацитація.

Успішність програм допоміжних репродуктивних технологій значною мірою залежить від якості та функціональної повноцінності сперматозоїдів, зокрема їх здатності до запліднення яйцеклітини. Одним із ключових процесів, які забезпечують таку здатність, є капацитація — комплекс послідовних молекулярних змін у мембрані та цитоплазмі чоловічих статевих клітин, необхідних для набуття гіперактивності та акросомальної реакції (АР). Цей процес контролюється низкою сигнальних каскадів, у тому числі за участю кальцієвих каналів, системи циклічного аденозинмонофосфату/про-

теїнкінази А (цАМФ/ПКА) та тирозинкіназ, чутливих до змін мікрооточення [2].

Капацитація сперматозоїдів в умовах *in vivo* відбувається в жіночих статевих шляхах, зокрема в матці та яйцепроводі [14]. Жіночий репродуктивний тракт ссавців характеризується гіпоксичними умовами з рівнем O_2 від 2 до 8 %. Рівень кисню в яєчниках становить 5—8 %, тоді як у фаллопієвих трубах і порожнині матки він знижується до 2—3 % [11]. За участю білків плазми жіночих секретів відбуваються зміни стану плазматичної мембрани сперматозоїдів, які призводять до гіперполяризації мембранно-

Цитування: Петрушко МП, Юрчук ТО. Гіпоксія як модулюючий чинник капацитації та кріорезистентності сперматозоїдів людини. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2025; 35(4): 233—8. <https://doi.org/10.15407/cryo35.04.221>

© Видавець ВД «Академперіодика» НАН України, 2025. Стаття опублікована на умовах відкритого доступу за ліцензією CC BY-NC-ND license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

ISSN 2307-6143. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2025. Т. 35, № 4

го потенціалу, підвищення рівня внутрішньоклітинного цАМФ та активації сигнальних каскадів фосфорилування, що сприяє гіперактивній рухливості та готовності сперматозоїдів до АР [15].

Капацитація *in vitro* індукується шляхом культивування сперматозоїдів у спеціальних середовищах, які імітують умови жіночого репродуктивного тракту [6]. Середовища інкубації та капацитації сперматозоїдів містять вуглеводи, амінокислоти, ліпіди та мікроелементи. Тривалість інкубації, концентрація компонентів та температура вважаються критичними для ефективності процесу капацитації. Одним з компонентів середовища *in vitro* та критичним регулятором функції сперматозоїдів є кисень. Як зазначалося вище, у природних умовах капацитація відбувається в гіпоксичному середовищі жіночих статевих шляхів, однак більшість стандартних протоколів не враховують цей фактор. Результати досліджень свідчать, що модифікація рівня кисню під час культивування сперматозоїдів може впливати на їхню біологічну активність [3]. Таким чином, оксигенація середовища інкубації є важливим регулятором функціональної активності сперматозоїдів на етапі капацитації *in vitro*.

У сучасній репродуктологічній практиці застосовують різні підходи до кріоконсервування сперматозоїдів як за нормозооспермії, так і за патологічних змін еякуляту [8, 13]. Відомо, що більшість маніпуляцій на етапі підготовки сперматозоїдів до низькотемпературного зберігання, включно з капацитацією, здійснюються за умов нормоксії [12].

Питання щодо оптимального часу проведення кріоконсервування — перед чи після капацитації сперматозоїдів — залишається дискусійним і недостатньо вивченим.

Метою дослідження було оцінити вплив рівня оксигенації під час інкубації перед кріоконсервуванням на ефективність капацитації та з'ясувати, чи впливає капацитація на кріорезистентність сперматозоїдів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У дослідження було включено еякуляти 30 здорових чоловіків репродуктивного віку з нормозооспермією. Усі учасники надали письмову інформовану згоду на використання біоматеріалу. Критеріями включення були: відсутність

інфекцій сечостатевого тракту, запальних або системних захворювань, а також відсутність у анамнезі патологій репродуктивної системи. Після збору еякулят інкубували впродовж 30 хв при температурі 37 °С. Після розрідження проводили базовий аналіз спермограми відповідно до рекомендацій Всесвітньої організації охорони здоров'я. Оцінювали такі параметри: об'єм еякуляту, рН, концентрацію сперматозоїдів, загальну кількість сперматозоїдів, їхню рухливість (прогресивну/непрогресивну, нерухомі форми) та життєздатність (забарвленням еозин-нігрозином). Після цього еякулят нашаровували на 1 мл градієнта щільності «SpermGrade» (CooperSurgical, США) у стерильних конічних пробірках. Спочатку вносили 1 мл 80%-вого градієнта, поверх якого акуратно нашаровували 1 мл 40%-вого градієнта, а зверху — 1–2 мл попередньо розрідженого еякуляту. Центрифугування проводили при 300–400 g впродовж 20 хв при кімнатній температурі. Після цього надосад обережно видаляли, а осад ресуспендували у середовищі «Global total forfertilization» (CooperSurgical). Для проведення капацитації використовували метод *swim-up*. Для цього до осаду обережно додавали 0,5 мл середовища та інкубували впродовж 60 хв у мультигазовому інкубаторі «SANYO MCO-19M» (Sanyo Electric Co., Японія) при температурі 37 °С за концентрацій O₂ 1, 5 та 21 %. Після завершення інкубації верхній шар, збагачений рухливими сперматозоїдами, обережно відбирали для подальшого аналізу. Таким чином, зразки були розподілені на три групи, кожна з яких інкубували в наступних умовах: група 1 — 1% O₂ (гіпоксичні умови), група 2 — 5% O₂ (фізіологічна норма для жіночого репродуктивного тракту), група 3 (контрольна) — 21% O₂ (атмосферний рівень).

Кількість сперматозоїдів, які пройшли АР, визначали за допомогою флуоресцентного маркування FITC-PSA (Sigma-Aldrich, США) згідно з протоколом виробника. Акросому вважали інтактною, якщо спостерігали рівномірне інтенсивне світіння акросомальної ділянки та повністю редагованою — за відсутності її світіння.

Для проведення кріобіологічного експерименту сперматозоїди відбирали до початку і через годину культивування *in vitro* за різних умов оксигенації. Заморожування зразків проводили за адаптованим протоколом M. Di Santo

та співавт. [4]. Сперматозоїди витримували впродовж 10 хв у 7%-вому розчині гліцерину (Merck KGaA, Німеччина) за кімнатної температури. Кріопротектор вводили поступово для мінімізації осмотичного шоку. Після завершення експозиції суспензію клітин розподіляли у кріовіали по 0,5 мл (Thermo Fisher Scientific, США). Контейнери маркували та розташовували на відстані близько 5 см над рівнем рідкого азоту ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) на 10—15 хв, після чого зразки швидко занурювали у рідкий азот ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) для довготривалого зберігання.

Розморожування зразків здійснювали шляхом швидкого занурення кріовіал у водяну баню, нагріту до $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. З метою мінімізації осмотичного шоку після повного зникнення твердої фази зразок поступово розбавляли середовищем без кріопротектора. Кріопротектор видаляли шляхом центрифугування з подальшим відбором надосаду. Після розморожування визначали частоту виживання клітин шляхом оцінки їхньої життєздатності.

Статистичний аналіз отриманих даних виконували з використанням програми «GraphPad Prism (10.4.1)» (GraphPad Software, США). У всіх експериментах перевіряли нормальність розподілу даних за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Для порівняння груп застосовували однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) з пост-хок тестом Тьюкі. Відмінності вважали значущими при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

На першому етапі дослідження було проаналізовано базові клініко-демографічні характеристики обстежених осіб. Середній вік учасників становив ($29,8 \pm 3,5$) років, індекс маси тіла — ($22,2 \pm 4,3$) $\text{кг}/\text{м}^2$. Після оцінки загальних антропометричних параметрів було проведено аналіз сперміологічних показників: об'єм еякуляту

становив ($2,67 \pm 0,51$) мл, що відповідає нормальним фізіологічним значенням; загальна концентрація сперматозоїдів дорівнювала ($62,7 \pm 19,2$) млн/мл; рухливість — ($61,9 \pm 9,4$) %; життєздатність — ($77,1 \pm 5,6$) %, яка свідчить про високу кількість живих клітин у зразках.

Після 60-хвилинної інкубації зразків частота рухливості та життєздатності клітин змінювалася в залежності від умов інкубації (таблиця).

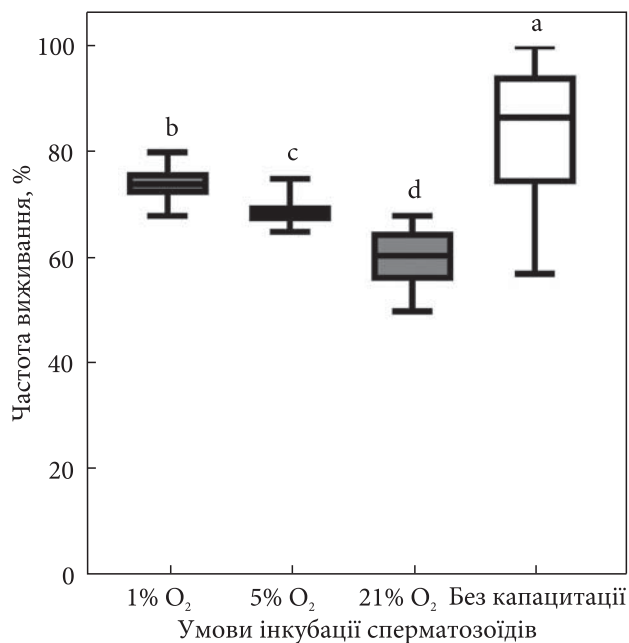
Отримані результати свідчать про виражений вплив рівня O_2 , за умов капацитації *in vitro*, на функціональні характеристики сперматозоїдів. Найвищі показники рухливості були визначені під час інкубації сперматозоїдів за умов помірної гіпоксії (група 2), що перевищувало зазначений показник в групах 1 та 3. За рівня O_2 5 % відзначався більш виражений прояв гіперактивних рухів, що вказує на потенційну перевагу помірної гіпоксії для активації капацитаційних процесів. Відзначалося підвищення життєздатності сперматозоїдів групи 2. З огляду на цей факт можна припустити, що знижена (5 % O_2) гіпоксія створює оптимальні умови для збереження функціональних характеристик сперматозоїдів, тоді як надмірна гіпоксія (1 % O_2) і нормоксія супроводжуються зменшенням цього показника, що вказує на важливість точного контролю рівня кисню під час маніпуляцій із репродуктивними клітинами.

Після години інкубації сперматозоїдів у середовищах із різною концентрацією O_2 рівень індукованої АР був найнижчим у групі 3, при цьому у групі 2 — найвищим. Індукцію АР забезпечує середовище, яке відповідає фізіологічним умовам жіночих статевих шляхів [11]. Інкубація при 1 % O_2 створює лужне середовище, що, можливо, гальмує ініціацію АР, зберігаючи більше сперматозоїдів з інтактною акросомою [18]. Крім того, вважають, що підвищений рівень O_2 може спричинити надмірне утворення

Функціональні показники сперматозоїдів людини через годину після інкубації за різних умов оксигенації *in vitro*

Показники	Група 1	Група 2	Група 3
Рухливість, %	$50,4 \pm 9,3$	$59,2 \pm 4,5$	$49,2 \pm 8,7$
Життєздатність, %	$70,3 \pm 9,4$	$79,2 \pm 9,5^*$	$66,1 \pm 9,5$
Кількість клітин з АР, %	$21,6 \pm 2,9$	$26,8 \pm 2,3$	$14,3 \pm 2,5^{**}$

Примітки: * — різниця значуща порівняно з показниками групи 1, $p < 0,05$; ** — різниця значуща порівняно з показниками груп 1 та 2, $p < 0,01$.



Кріорезистентність капацитованих та некапацитованих сперматозоїдів. a, b, c, d — різниця значуща між групами, $p < 0,05$

активних форм кисню (АФК), яке призводить до пошкодження мембран і передчасного виснаження функціонального потенціалу сперматозоїдів [1]. Низький рівень O₂ забезпечує помірний рівень АР. Ймовірно, це пов'язано з обмеженим енергозабезпеченням гліколітичного і мітохондріального походження [5]. Таким чином, отримані дані вказують на те, що знижена гіпоксія (5 % O₂) створює сприятливі умови для перебігу капацитації сперматозоїдів *in vitro*, тоді як інкубація за рівнів 1 і 21 % O₂ може мати пригнічуючий вплив на цей процес.

Частота виживання некапацитованих сперматозоїдів становила (84,51 ± 2,5) %, що узгоджується з референтними даними для еякулятів здорових донорів [17]. Після проведення капацитації за різних рівнів оксигенації з подальшим кріоконсервуванням було виявлено чітку залежність частоти виживання сперматозоїдів від концентрації O₂ під час інкубації (рисунок).

Найвищі показники виживання сперматозоїдів після капацитації та кріоконсервування зафіксовано за умов 1 % O₂, тоді як найнижчі — за нормоксії. Цей факт вказує на те, що рівень кисню під час капацитації є критичним чинником, який визначає подальшу життєздатність клітин. Імовірно, зниження оксигенації зменшує оксидативний стрес, який у нормоксичних умовах може посилюватися та викликати ушкодження мембран, мітохондрій і порушення гомеостазу сперматозоїдів [16].

Деякі автори вважають, що гіпоксія може індукувати аутофагію для збереження енергії та перероблення пошкоджених структури у сперматозоїді [7]. Аутофагія може відігравати важливу роль у підготовці сперматозоїда до АР, зокрема шляхом регуляції ремоделювання мембран, утилізації мітохондрій і мобілізації енергетичних ресурсів. Порушення механізмів гіпоксичної відповіді або дисфункція аутофагії можуть перешкоджати реалізації АР, які здатні знижувати запліднювальну здатність сперматозоїдів. Одержані результати мають практичне значення для створення умов підготовки сперматозоїдів до запліднення шляхом інсемінації, ICSI або IMSI [10].

Оскільки підвищена продукція АФК під час капацитації може запускати апоптоз або викликати пошкодження мембран і ДНК, зниження частоти виживання кріоконсервованих сперматозоїдів після капацитації за нормоксичних умов, ймовірно, пов'язане саме з оксидативним стресом. Це підтверджують результати дослідження, які виявили підвищення рівнів ліпопероксидації та фрагментації ДНК сперматозоїдів у залежності від їхнього функціонального стану [19]. Гіпоксія, яка є характерною як для фізіологічного середовища придатка яєчка, так і для окремих етапів кріоконсервування, здатна модулювати активність NIF-залежних сигнальних шляхів, впливати на енергетичний метаболізм та знижувати поріг активації капацитаційних механізмів [9]. У поєднанні з гіпоосмотичним стресом, який також ініціює каскадні зміни мембранної структури, виникає ризик передчасної або неадекватної активації сперматозоїдів після розморожування, внаслідок якого може знижуватися їхній запліднювальний потенціал.

Отримані результати підкреслюють необхідність оптимізації умов капацитації та кріоконсервування з урахуванням фізіологічного рівня кисню та можуть сприяти підвищенню частоти виживання сперматозоїдів після розморожування. Подальші дослідження слід спрямувати на детальне вивчення взаємодії NIF-залежних механізмів із показниками кріорезистентності, що відкриває перспективи для персоналізованого підходу в репродуктивній медицині.

ВИСНОВКИ

Рівень кисню під час інкубації *in vitro* впливає на функціональні характеристики сперматозоїдів. Показано, що гіпоксія за 5 % O₂ підтри-

мує рухливість і життєздатність сперматозоїдів та стимулює активацію капацитації.

Встановлено, що кріорезистентність некапацитованих сперматозоїдів вища, ніж у капаци-

тованих. Підвищення концентрації кисню під час індукованої капацитації сперматозоїдів призводить до зниження частоти їхнього виживання після кріоконсервування.

ЛІТЕРАТУРА

1. Agarwal A, Virk G, Ong C, et al. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health*. 2014; 32(1): 1–17.
2. Abruzzese GA, Sanchez-Rodriguez A, Roldan ERS. Sperm metabolism. *Mol Reprod Dev*. 2024; 91: 1–18.
3. Balbach M, Ghanem L, Violante S, et al. Capacitation induces changes in metabolic pathways supporting motility of epididymal and ejaculated sperm. *Front Cell Dev Biol*. [Internet]. 2023 Jun 27 [cited 2025 Jun 15]; 11: 1160154. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2023.1160154/full>
4. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, et al. Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Adv Urol*. [Internet]. 2011 Dec 13 [cited 2025 Jun 15]; 2012: 854837. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2012/854837>
5. Ferramosca A, Zara V. Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. *Biomed Res Int*. [Internet]. 2014 Mar 25 [cited 2025 Jun 15]; 2014: 902953. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2014/902953>
6. González LN, Giaccagli MM, Herzfeld JD, et al. A side-by-side comparison of different capacitation media in developing mouse sperm fertilizing ability. *Sci Rep*. [Internet]. 2024 Jun 21 [cited 2025 Jun 15]; 14(1): 14287. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-024-65134-w>
7. Hu J, Wu J, Liu X, et al. Hypoxia enhances autophagy level of human sperms. *Sci Rep*. [Internet]. 2024 Apr 11 [cited 2025 Jun 15]; 14: 8465. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-024-59213-1>
8. Hungerford AJ, Harrison N, Bakos HW, et al. Development of an improved medium for the preservation of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet*. 2025; 42: 2167–80.
9. Kumar H, Choi DK. Hypoxia inducible factor pathway and physiological adaptation: a cell survival pathway? *Mediators Inflamm*. [Internet]. 2015 Sep 27 [cited 2025 Jun 15]; 2015: 584758. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2015/584758>
10. Luna D, Hilario R, Dueñas-Chacón J, et al. The IMSI procedure improves laboratory and clinical outcomes without compromising the aneuploidy rate when compared to the classical ICSI procedure. *Clin Med Insights Reprod Health*. 2015; 9: 29–37.
11. Ng KYB, Mingels R, Morgan H, et al. *In vivo* oxygen, temperature and pH dynamics in the female reproductive tract and their importance in human conception: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2018; 24(1): 15–34.
12. Ozimic S, Ban-Frangez H, Stimpfel M. Sperm cryopreservation today: approaches, efficiency, and pitfalls. *Curr Issues Mol Biol*. 2023; 45(6): 4716–34.
13. Petrushko M, Yurchuk T, Todorov P, et al. New method for cryoprotectant-free freezing of human oligoasthenoteratozoospermic spermatozoa with high-molecular polymer. *Cryobiology*. 2021; 103: 39–44.
14. Puga Molina LC, Luque GM, Balestrini PA, et al. Molecular basis of human sperm capacitation. [Internet]. *Front Cell Dev Biol*. 2018 Jul 27 [cited 2025 Jun 15]; 6: 72. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2018.00072/full>
15. Sáez-Espinosa P, Huerta-Retamal N, Robles-Gómez L, et al. Influence of *in vitro* capacitation time on structural and functional human sperm parameters. *Asian J Androl*. 2020; 22(5): 447–53.
16. Sengupta P, Pinggera GM, Calogero AE, Agarwal A. Oxidative stress affects sperm health and fertility — Time to apply facts learned at the bench to help the patient: Lessons for busy clinicians. *Reprod Med Biol*. [Internet]. 2024 Sep 01 [cited 2025 Jun 15]; 23(1): e12598. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rmb2.12598>
17. Tamburrino L, Traini G, Marcellini A, et al. Cryopreservation of human spermatozoa: functional, molecular and clinical aspects. *Int J MolSci*. 2023 Feb 28 [cited 2025 Jun 15]; 24(5): 4656. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/5/4656>
18. Tian Y, Chen X, Pu J, et al. Spermatogenic cell-specific type 1 hexokinase (HK1S) is essential for capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation and male fertility in mice. [Internet]. *PLoS Genet*. 2024 Jul 29 [cited 2025 Jun 15]; 20(7): e1011357. Available from: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1011357>
19. Yurchuk T, Pavlovich O, Gapon G, et al. Lipid peroxidation and DNA fragmentation in fresh and cryopreserved spermatozoa of men at different spermatogenesis state. *Ukr Biochem J*. 2021; 93(3): 24–9.

Отримано 22.06.2025

Прийнято до друку 20.11.2025

M.P. Petrushko ^{1,*}, T.O. Yurchuk ^{1, 2}

¹ Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

² InLife Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, , Olsztyn, Poland

* petrushkomarina@gmail.com

HYPOXIA AS A MODULATING FACTOR OF HUMAN SPERM CAPACITATION AND CRYORESISTANCE

Despite increasing interest to the role of hypoxia in reproductive processes, its impact on sperm capacitation and cryoresistance remains insufficiently described. This study investigated the effect of oxygen tension during pre-cryopreservation sperm incubation on the capacitation efficiency and examined the relationship between capacitation and cryoresistance. According to the WHO criteria, ejaculates from 30 healthy normozoospermic men were analyzed. Functional characteristics and cryoresistance of spermatozoa were assessed after density gradient processing and *in vitro* capacitation under 1, 5 and 21% oxygen concentrations. An incubation of human spermatozoa under moderate hypoxia was found to positively influence the viability, motility, and capacitation activation. For the first time, we have demonstrated that oxygen tension during *in vitro* incubation is a critical factor determining sperm survival following thawing. These findings suggest that moderate hypoxia may represent a promising biotechnological strategy to improve sperm cryopreservation protocols and enhance the efficiency of assisted reproductive technologies.

Key words: cryopreservation, hypoxia, human spermatozoa, capacitation.