

## PERSPECTIVELE CRIOCONSERVĂRII MATERIALULUI SEMINAL LA APLICAREA PRINCIPIILOR VITRIFICĂRII CINETICE

**Balan Ion, Roșca Nicolae, Balacci Sergiu, Buzan Vladimir, Furdui Vlada, Cretu Roman, Bacu Gheorghe, Temciuc Vlad, Vîhrist Ecaterina, Filippov Artiom**  
Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie, Universitatea de Stat din Moldova  
e-mail: [balanion@rambler.ru](mailto:balanion@rambler.ru)

**Abstract:** *Currently, the most widely used application of sperm preservation is slow freezing, but during this process, sperm undergo cryodestruction, which reduces viability and fertility properties. One of the alternatives to slow freezing for spermatozoa is kinetic vitrification, with emerging potential showing encouraging results for vitrification of sperm used in assisted reproduction technologies of the animal kingdom. The application of kinetic vitrification principles is seen as a perspective methodology to different experimental models of semen cryopreservation. Kinetic vitrification, in addition to being free of permeable cryoprotectants, includes other advantages such as simplicity, speed, low cost, maintenance of important physiological parameters such as mitochondrial membrane potential and DNA integrity. Furthermore, vitrification without cryoprotectants may produce more biological and smaller transverse changes in reproductive cells. Also, the success of cryopreservation is measured by sperm motility after devitrification, where kinetic vitrification has not yet achieved satisfactory results in experiments performed on the semen of some animals. Thus, in order to elucidate some authentic statements regarding the success of vitrification on the quality of the devitrified semen of different animal species, more studies are needed to obtain sperm viability after devitrification.*

**Keywords:** *animal, sperm material, vitrification, cryopreservation, cryoprotector, reproduction.*

Obiectivul de bază al acestei sinteze este de a prezenta principiile esențiale ale vitrificării cinetice, principalele constatări din literatura accesibilă de specialitate și perspectivele de utilizare a vitrificării în procesul de crioconservare a materialului seminal al diferitor specii de animale.

Crioconservarea reprezintă o metodă de conservare și depozitare a materialelor biologice, inclusiv a spermei, care în prezent este cea mai utilizată metodă de conservare în criobiologie. Deseori, calitatea și capacitățile de fecundare ale spermei decongelate sunt compromise de temperaturile de congelare-decongelare; formarea cristalelor de gheață; stresul fizic, chimic, osmotic și oxidativ; tehnologiile și echipamentele neadecvate. Principalele cauze ale calității reduse a spermilor sunt modificările fazei lipidice și/sau creșterea peroxidării lipidice [7].

Pentru a preveni deteriorarea structurilor membranoase, reducerea temperaturii de nucleere, diminuarea dimensiunii cristalelor de gheață, modularea deshidratării și transformărilor fazice ale lipidelor se aplică crioprotectori cu proprietăți protectoare intra- și extracelulare [15]. În special, necesită concentrații mari de crioprotectori procesul de vitrificare de echilibru, care cresc vâscozitatea mediului și reduc formarea cristalelor de gheață la congelare-decongelare [5]. Cu toate acestea, concentrațiile mari de crioprotectori sunt citotoxice pentru celulele reproductive din cauza citotoxinelor dăunătoare [13.] Prin urmare, Con-suegra și colab. [2] au folosit vitrificarea de echilibru fără aplicarea concentrațiilor mari de crioprotectori permeabili la sperma de cabaline, ceea ce a determinat opțiunile de reducere

a efectelor nocive ale crioprotectorilor, care pătrund în spermatozoizi. În această ordine de idei, este necesară o diminuare drastică a frecvenței utilizării crioprotectorilor sau eliminarea lor din protocoalele de crioconservare.

Drept urmare, o alternativă la utilizarea concentrației mari de crioprotector este vitrificarea cinetică [9], în care utilizarea crioprotectorilor permeabili este înlocuită cu cei nepremiabili și care, în același timp, este opțională. În acest scenariu, vitrificarea cinetică este o alternativă la metodele de vitrificare de echilibru sau convenționale pentru spermatozoizi și se produce rapid, cu excluderea crioprotectorilor permeabili [17]. Astfel, aplicarea principiilor vitrificării cinetice se consideră o metodologie de perspectivă la diferite modele experimentale a crioconservării materialului seminal.

Reacțiile biologice și chimice din celulele vii sunt reduse dramatic la temperaturi negative și reprezintă un fenomen, care poate duce la o posibilă conservare pe termen lung a materialului biologic [8; 20]. Bioconservarea începe cu o reducere a temperaturii de la 37 °C la 0-10 °C, iar crioconservarea la -196 °C, considerată o metodă eficientă de conservare a spermei, cu menținerea integrității morfofuncționale a gameților după decongelare [10; 11; 16].

Un rol important în procesul de crioconservare îl are apa, conținutul cărei este variabil în spermii diferitor specii de animale, aproximativ 60 până la 85%, atât în formă liberă, cât și limitată [1; 20]. Forma legată se referă la apa hidratată la amestecuri complexe de celule, precum proteine, lipide și temperatura de tranziție sticloasă a apei pure. Mai mult, reducerea progresivă și, în cele din urmă, absența apei lichide (complet înghețate) limitează toate procesele metabolice [13].

Procesul de congelare propriu zis, reprezintă îndepărtarea apei, astfel încât apa lichidă să fie transformată în gheață fie în interiorul celulei, fie în exteriorul ei. Principalul obstacol pe care trebuie să îl depășească celulele la temperaturi scăzute este tranziția fazei de la apă la gheață. Formarea cristalelor de gheață necesită, cel puțin, un eveniment inițial de nucleere. Viteza de nucleere a cristalelor de gheață intracelulară este în funcție de temperatura și compoziția citoplasmei. În teoria nucleerii clasice, un nucleu stabil de gheață este format prin gruparea aleatorie a moleculelor de apă. Prin urmare, cele două procese cinetice care au loc în timpul răcirii celulelor, adică creșterea gheții și pierderea apei din celulă, au loc într-un ritm distinctiv și acest proces este influențat de viteza de răcire impusă sistemului [8].

La congelarea lentă, celulele sunt răcite în suspensie și gheața se nuclează, mai întâi, în spațiul extracelular. În cazul în care, se menține o reducere controlată a temperaturii, persistă o presiune osmotică suficientă pentru împiedicarea formării cristalelor de gheață în interiorul celulei. Totodată, celulele se micșorează continuu în timpul procesului din cauza efluxului de apă [13]. În timpul înghețului rapid, există mai puțin timp pentru ca apa să se miște în spațiul extracelular și devine suprarăcită, ceea ce duce la formarea de gheață intracelulară.

În vitrificare proprietatea lichidelor vâscoase permit răcirea rapidă mult sub temperatura lor de topire și se solidifică prin evitarea cristalizării. Substanța suprarăcită cu proprietățile fizice lichide capătă ulterior proprietăți solide odată ce ajunge sub o anumită temperatură, numită temperatura de tranziție sticloasă [3]. În rezultat vitrificarea depășește procesele de cristalizare și, prin urmare, se evită potențialele efecte adverse ale acestora.

În prezent, există două abordări principale pentru crioconservarea spermei: congelarea convențională (lentă și rapidă) și vitrificarea (de echilibru și cinetică). Totodată, au fost aplicate diverse metodologii referitoare la dispozitivele utilizate, proporțiile de diluție, compoziția agenților crioprotectori, regimurile de congelare și decongelare [10]. În plus, congelarea lentă poate fi utilizată prin diluarea probei experimentale cu crioprotectori, sau în care crioprotectorii sunt adăugați după echilibrare, cu varietăți ale vitrificării de echilibru, sau tradiționale și vitrificării cinetice [9].

La congelarea lentă convențională, sperma este răcită treptat, pe etape, de la temperatura de 4-5 °C până la -196 °C, iar la congelarea convențională rapidă, este răcită într-o

singură etapă, de la temperatura de 4-5 °C până la -196 °C. Viteza de reducere a temperaturii este asociată cu concentrațiile scăzute de crioprotectori permeabili și nepermeabili [10]. Această metodă necesită timp și poate dura 2-4 ore, care variază în funcție de specia animalului și necesită utilizarea condițiilor frigorifice [16; 21]. Pe de altă parte, ambele tehnologii de crioconservare pot fi realizate prin vitrificare de echilibru sau vitrificare cinetică, fără utilizarea crioprotectorilor. De exemplu, la protocolul convențional de congelare rapidă, după adăugarea unui crioprotector, proba experimentală intră în contact direct cu vaporii de azot la -80 °C cu scufundarea în azot lichid (-196 °C). Protocoalele rapide diferă de protocoalele lente prin faptul că o mare parte a deshidratării și a permeabilității crioprotectoare are loc înainte de începerea refrigerării și răcirea este de obicei efectuată într-o singură etapă, în care proba experimentală este răcită direct de la o temperatură negativă mare [10; 21].

Procesul de vitrificare este urmat de solidificarea lichidului la temperaturi scăzute, în stare amorfă sau sticloasă, fără formarea de cristale de gheață extra- și intracelulare în timpul procesului de vitrificare și de devitrificare a materialului biologic. Aceste procese reprezintă combinația de efecte termodinamice și cinetice, care asigură evitarea nucleerii și creșterii cristalelor de gheață în timpul răcirii și constituie mecanismul, prin care se realizează vitrificarea. Cu toate acestea, dacă viteza de decongelare este lentă, moleculele din cristalele de gheață se pot rearanja cu formarea cristalelor mai mari [7], dăunătoare sistemelor biologice.

În ceea ce privește diferențele daunelor cauzate de procesul de crioconservare, inclusiv etapele de refrigerare și utilizare a diluanților, cu sau fără crioprotectori, s-a constatat, că devierile mobilității, viabilității și activității mitocondriale a spermilor sunt daune comune, asociate cu tehnicile de crioconservare. De exemplu, congelarea lentă poate provoca leziuni morfologice, reducerea reacției acrozomale și deteriorarea sporită a cromatinei. Daunele cauzate de vitrificarea cinetică se referă, în principal, la pierderea mobilității și, în consecință, fertilitatea.

În literatura de specialitate se descriu trei factori esențiali pentru obținerea stării sticloase: creșterea vitezei de răcire, creșterea vâscozității și scăderea volumului probei experimentale. Metodele de crioconservare a spermei variază în funcție de viteza de congelare, concentrația de crioprotector și durata de reducere a temperaturii, care include congelare lentă (0,5-0 °C/minut), congelare rapidă (50-400 °C/minut), congelare ultrarapidă (aproximativ 2500 °C/minut) și vitrificare (aproximativ 20 000 °C/minut) [14].

În acest context, adăugarea de crioprotectori a devenit esențială în metodele convenționale de crioconservare, pentru a proteja spermatozoizii de deteriorarea cauzată de expunerea la temperaturi scăzute. Conform lui Fahy G.M. [3], cu cât concentrația de crioprotector este mai mică, cu atât mai rapid trebuie să desfășurat procesul, pentru a evita formarea gheții. În mod similar, dacă există o creștere a vâscozității, sau a vitezei de răcire, sau scăderea volumului, vor crește șansele de a obține starea vitroasă.

Adăugarea de agenți crioprotectori, crește vâscozitatea în mediul de crioconservare, facilitând, astfel, procesul de vitrificare. Crioprotectorii protejează spermii de criolesiuni prin creșterea fluidității membranei plasmatică, reordonarea lipidelor și deshidratarea parțială, reducând punctul de îngheț, limitând, astfel, formarea de cristale de gheață intracelulare, care și este unul dintre principalele mecanisme biofizice ale morții spermatozoizilor [7; 9].

Crioprotectorii nepenetranți pot induce o creștere a osmolarității mediului extern, producând trecerea apei din interiorul celulei către mediul extracelular și împiedicând formarea cristalelor de gheață în timpul congelării. Crioprotectorii, în ansamblu, sunt reprezentați de macromolecule cu greutate moleculară mare, inclusiv carbohidrați complecși, iar osmolaritatea, la rândul său, poate fi împărțită în molecule active osmotice și compuși inactivi osmotici, inclusiv di- și polizaharidele. Adăugarea crioprotectorilor în vitrificarea de echilibru poate reduce concentrațiile de crioprotectori permeabili în mediul de vitrificare, minimizând, astfel, daunele cauzate de toxicitatea acestora [11; 16].

Adesea dintre zaharide în vitrificarea cinetică este folosită zaharoza, pentru a crește

efectul protector al celulelor și, care acționează ca un tampon osmotic împotriva stresului celular, cauzat în timpul vitrificării și devitrificării. În ciuda acestor beneficii, crioprotectorii nepenetranți au și unele dezavantaje în vitrificarea cinetică a spermei. Când doar dizaharidele sunt folosite ca crioprotectori, există o reducere semnificativă a mobilității, cauza cărei rămâne necunoscută. În schimb, modificările mobilității în timpul procesului de vitrificare-devitrificare se pot datora modificărilor potențialului membranei mitocondriale. Una dintre modalitățile de creștere a vâscozității mediului și/sau a diluantului utilizat și de a proteja membrana plasmatică a gameților în timpul procesului de vitrificare cinetică este includerea aditivilor proteici [7].

Un alt factor, care a fost oarecum neglijat este conținutul de apă prezent în spermatozoizi și diferențele de permeabilitate structurală a apei, ultimele reprezentând valoarea diferenței vitezei optime de răcire pentru diferite tipuri de celule. Protocoalele de crioconservare trebuie să atingă un echilibru între condițiile optime pentru fiecare tip de celulă, în funcție de conținutul de apă, dimensiunea și morfologia celulei și coeficientul de permeabilitate la apă al membranei plasmatică. În practică, deoarece volumul de apă și morfologia spermei sunt diferite între specii, protocoalele de crioconservare trebuie să fie și ele diferite. De exemplu Katkov și colab. [9], au recoltat material seminal de la trei specii de păsări, care a fost supus congelării lente și vitrificării cinetice, folosind aceeași viteză de congelare, utilizată pentru sperma mamiferelor. Protocolul de vitrificare cinetică nu a avut succes, iar autorii au atribuit acest rezultat particularităților morfologice și diferențelor în conținutul de apă al spermatozoidilor de păsări și mamifere. În rezultat, acești autori au declarat, că vitrificarea cinetică a materialului seminal aviar ar necesita o viteză de congelare mai rapidă.

Un alt punct important, în procesul de vitrificare este volumul probei crioconservate [7]. Există două metode de crioconservare a spermei, în funcție de volum și protecție împotriva contaminării: metode non-aseptice, în care proba este plasată direct în azot lichid și metode aseptice, în care proba nu intră în contact direct cu azotul lichid. Experimental s-a constatat, că pot fi vitrificate doar volume mici, cuprinse între 1 și 40  $\mu$ l de suspensie de spermă și, este de preferat metoda de vitrificare a paietelor, deoarece permite izolarea spermatozoidilor de azotul lichid, cu o reducere maximală a riscului potențial de contaminare microbiană. Ulterior, s-a elaborat o nouă metodă de vitrificare aseptică fără crioprotector, care permite vitrificarea unor volume mai mari, până la 500  $\mu$ l de spermatozoizi. În acest studiu, spermatozoidii vitrificali prin tehnologie aseptică, fără crioprotector, au prezentat caracteristici funcționale superioare. Indicii de mobilitate, integritate ale membranelor citoplasmatice și acrozomale au fost, semnificativ, mai mari după vitrificare, decât după congelarea convențională.

Vitrificarea cinetică, pe lângă faptul că este lipsită de crioprotectori permeabili, diferă de alte metode de crioconservare prin viteze extrem de mari de răcire și devitrificare relativ instantanee, condiții care împiedică formarea gheții în interiorul spermiilor. În plus, întregul proces de vitrificare și devitrificare durează doar câteva secunde [7].

În ceea ce privește utilizarea numai a crioprotectorilor nepermeabili, Isachenko și colab. [7] au evaluat diferite combinații de carbohidrați (zaharoză și trehaloză) și proteine (albumină serică umană) la bărbați și au descoperit că congelarea lentă și vitrificarea cinetică sunt similare în ceea ce privește motilitatea spermei și integritatea ADN-ului. Cu toate acestea, la câini, rezultatele vitrificării cinetice folosind un mediu diluant și un mediu de gălbenuș de ou, nu au fost considerate acceptabile pentru aceiași parametri.

Metodele propuse anterior au fost descrise ca sisteme deschise și neaseptice, deoarece dispozitivele utilizate nu au împiedicat contactul direct al probei cu azotul lichid [7]. Au fost folosite sisteme deschise pentru a elimina gheața și a crea o stare sticloasă în locul

ei, necesitând mici suspensii lichide reci, sau doar apă, la viteze de îngheț ultrarapide, tehnică prin care mici picături de material seminal (aproximativ 30  $\mu$ L) au fost plasate direct în azot lichid, având ca scop obținerea vitrificării dorite.

Folosind izolarea probei spermatice ca indicator al asepsei [17] și al eficacității vitrificării cinetice, au fost evaluate diferite dispozitive, care permit izolarea spermei de azotul lichid, cu un risc scăzut de contaminare microbiană în timpul congelării și păstrării. Succesul devitrificării, la fel, depinde de proprietățile dispozitivului utilizat.

Temperaturile băii de apă sau ale soluției de devitrificare variază pentru sperma diferitor specii de animale domestice și om [7; 20].

Congelarea lentă este încă principală metodă de crioconservare a spermei [9] la oameni [14] și animale domestice [18].

După cum sa menționat anterior, volumul de apă și morfologia celulelor spermatozoizilor diferitelor specii sunt diferite și acesta poate fi unul dintre factorii pentru care nu este posibil să se reproducă același protocol de vitrificare cinetică la toate speciile. În plus, este cunoscut, de exemplu, că crioconservarea afectează integritatea membranei plasmactice și că compoziția membranei plasmactice variază între specii [4] și, prin urmare, unele specii sunt mai susceptibile la deteriorare în procesul de crioconservare. Pentru vitrificarea cinetică, sunt încă necesare mai multe studii asupra acestor aspecte în scopul elucidării unor afirmații mai precise despre interferența protocolului asupra calității materialului seminal devitrificat.

Acest lucru demonstrează, că este necesar ca același protocol de evaluare a calității materialului seminal devitrificat, să fie aplicat de mai multe ori în experimente cu grupuri de animale similare, sau din aceeași specie, pentru a obține stabilitatea rezultatelor vitrificării și acuratețea repetabilității acestora. Până în prezent, acest lucru se observă în experimentele cu materialul seminal al puținelor specii de animale.

Vitrificarea cinetică are un mare potențial ca orice tehnologie emergentă și a devenit recent o tehnică alternativă, care arată rezultate încurajatoare pentru vitrificarea spermei, utilizate în tehnologii de reproducere asistată a regnului animal.

Avantajele acestei metodologii includ simplitatea, viteza, costul redus și menținerea unor parametri fiziologici importanți, cum ar fi potențialul membranei mitocondriale și integritatea ADN-ului. Mai mult decât atât, vitrificarea fără crioprotectori poate induce mai puține modificări biologice în celulele reproductive, în comparație cu congelarea convențională [19] și modificări transversale mai mici în spermatozoizi [17]. Un alt avantaj este, că utilizarea unor concentrații mari de crioprotectori permeabili, așa cum sunt utilizate în vitrificarea de echilibru, nu sunt necesare pentru vitrificarea cinetică [12] și poate reduce efectele de deteriorare a spermatozoizilor.

De asemenea, succesul crioconservării este măsurat prin mobilitatea spermatozoizilor după devitrificare, unde vitrificarea cinetică nu a obținut încă rezultate satisfăcătoare în experimentele efectuate pe materialul seminal al unor animale. Prin urmare, studiile suplimentare ar trebui să investigheze ce aditivi pot stimula cinetica spermatozoizilor după devitrificare și care este viteza specifică de încălzire pentru fiecare specie. Concentrația optimă de crioprotectori nepermeabili reprezintă un factor cheie pentru succesul vitrificării spermei și este specifică speciei, dar depinde și de metodologie [6] și necesită o atenție suplimentară de cercetare științifică.

## BIBLIOGRAFIE

1. Barquero V, Roldan ERS, Soler C, Yániz JL, Camacho M, Valverde A. Predictive capacity of boar sperm morphometry and morphometric sub-populations on reproductive success after artificial insemination. *Animals*. 2021;11(4):920.
2. Consuegra C, Crespo F, Dorado J, Diaz-Jimenez M, Pereira B, Ortiz I, Hidalgo M. Vitrification of stallion sperm using 0.25 ml straws: effect of volume, concentration, and carbohydrates (sucrose/trehalose/raffinose). *Anim Reprod*. 2019;206:69-77.

3. Fahy GM. Overview of biological vitrification. In: Tucker MJ, Liebermann J, editors. Vitrification in assisted reproduction. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2015:3-5.
4. Gautier C, Aurich C. “Fine feathers make fine birds” – The mammalian sperm plasma membrane lipid composition and effects on assisted reproduction. *Anim Reprod Sci.* 2022;246:106884.
5. Gibbons A, Bruno-Galarraga M, Fernandez J, Gonzalez-Bulnes A, Cueto M. Vitrified embryo transfer in Merino sheep under extensive conditions. *Anim Reprod.* 2019;16(2):297-301.
6. Hidalgo M. Recent advances in donkey sperm vitrification. *Reprod Domest Anim.* 2021;56(10):1274-1278.
7. Isachenko V, Rahimi G, Mallmann P, Sánchez R, Isachenko E. Technologies of cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa: asepticity as criterion of effectiveness. *Andrology.* 2017;5(6):1055-1063.
8. Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, Choi CW, Lee SR, Han J. Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res.* 2017;6(1):12-18.
9. Katkov II et al. Kinetic vitrification of spermatozoa of vertebrates: what can we learn from nature? In: Katkov I, editor. *Current frontiers in cryobiology.* Croatia: IntechOpen; 2012:3-40.
10. Li Y, Zhou L, Lv M, Ge P, Liu Y, Zhou D. Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2019;233:84-92.
11. Nagata MPB, Egashira J, Katafuchi N, Endo K, Ogata K, Yamanaka K, Yamanouchi T, Matsuda H, Hashiyada Y, Yamashita K. Bovine sperm selection procedure prior to cryopreservation for improvement of postthawed semen quality and fertility. *J Anim Sci Biotechnol.* 2019;10(1):91.
12. O'Neill HC, Nikoloska M, Ho H, Doshi A, Maalouf W. Improved cryopreservation of spermatozoa using vitrification: comparison of cryoprotectants and a novel device for long-term storage. *J Assist Reprod Genet.* 2019;36(8):1713-1720.
13. Pegg DE. Principles of cryopreservation. In: Wolkers WF, Oldenhof H, editors. *Cryopreservation and freeze-drying protocols.* 3rd ed. New York: Springer; 2015:3-19.
14. Schulz M, Risopatrón J, Uribe P, Isachenko E, Isachenko V, Sánchez R. Human sperm vitrification: a scientific report. *Andrology.* 2020;8(6):1642-1650.
15. Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim Reprod Sci.* 2016;169:2-5.
16. Silva HVR, Silva AR, Silvada LDM, Comizzoli P. Sperm cryopreservation and banking for the conservation of neotropical carnivores. *Biopreserv Biobank.* 2019;17(2):183-188.
17. Tao Y, Sanger E, Saewu A, Saewu A, Leveille M. Human sperm vitrification: the state of the art. *Reprod Biol Endocrinol.* 2020;18(1):17.
18. Thananurak P, Chuaychu-noo N, Thélie A, Phasuk Y, Vongpralub T, Blesbois E. Sucrose increases the quality and fertilizing ability of cryopreserved chicken sperms in contrast to raffinose. *Poult Sci.* 2019;98(9):4161-4171.
19. Wang M, Todorov P, Wang W, Isachenko E, Rahimi G, Mallmann P, Isachenko V. Cryoprotectants-free vitrification and conventional freezing of human spermatozoa: a comparative transcript profiling. *Int J Mol Sci.* 2022;23(6):3047.
20. Yashaswi S, Mona S. Biophysics of Cryopreservation. *Int J Thermodyn.* 2022;25(1):17-27.
21. Zainuddin ZZ, Tarmizi MRM, Yap KC, Comizzoli P, Symphorosa S. First evaluations and cryopreservation of semen samples from Sunda Clouded Leopards (*Neofelis diardi*). *Animals.* 2020;10(6):1072.