

УДК 612.616.014.43:615.014.41

О.В. Павлович*, О.Б. Ревенко, Г.О. Гапон

Оптимізація режиму відтавання криоконсервованої сперми людини при нормо- та патоспермії

UDC 612.616.014.43:615.014.41

O.V. Pavlovych*, O.B. Revenko, G.O. Gapon

Optimization of Thawing Regimen for Cryopreserved Human Sperm at Normo- and Pathospermia

Реферат: Внаслідок поширеного розвитку допоміжних репродуктивних технологій актуальним є вдосконалення способів криоконсервування спермій. У роботі досліджено показники морфофункціонального стану криоконсервованих спермій людини в нормі та при патології за різних способів відтавання. Усі зразки витримували над дзеркалом рідкого азоту, подальший нагрів спермій здійснювали на водяній бані (37, 50, 60, 70°C) та витримували за кімнатної температури до появи рідкої фази. Морфофункціональний стан спермій оцінювали за їхньою рухливістю та життєздатністю, а стан хроматину – за допомогою акридину оранжевого. Встановлено, що режим відтавання при 50°C (із попередньою інкубацією зразків у парах рідкого азоту (-150°C)) після криоконсервування спермій за 3-етапною програмою ефективно зберігає їх рухливість без змін цілісності мембрани та стану нуклеарного хроматину в нормі та при астенозооспермії. Відтавання зразків при кімнатній температурі за тих же умов є найбільш травматичним для спермій у випадку як нормо-, так і астенозооспермії.

Ключові слова: спермії людини, криоконсервування, відтавання, рухливість, деконденсація, хроматин.

Реферат: Вследствие широкого развития вспомогательных репродуктивных технологий актуальным является совершенствование способов криоконсервирования спермиев. В работе исследованы показатели морфофункционального состояния криоконсервированных спермиев человека в норме и с патологией при различных способах оттаивания. Все образцы выдерживали над зеркалом жидкого азота, дальнейший нагрев спермиев осуществляли на водяной бане (37, 50, 60, 70°C) и выдерживали в условиях комнатной температуры до появления жидкой фазы. Морфофункциональное состояние сперматозоидов оценивали, подсчитывая подвижность и жизнеспособность, а состояние хроматина клеток – с помощью акридина оранжевого. Установлено, что режим оттаивания спермиев при 50°C (с предварительной инкубацией образцов в парах жидкого азота (-150°C)) после криоконсервирования по 3-этапной программе эффективно сохраняет их подвижность без измененной целостности мембраны и состояния нуклеарного хроматина при нормо- и астенозооспермии. Оттаивание образцов при комнатной температуре в тех же условиях является наиболее травматичным для спермиев человека в случае как нормо-, так и астенозооспермии.

Ключевые слова: спермии человека, криоконсервирование, оттаивание, подвижность, деконденсация, хроматин.

Abstract: Due to the widespread development of assisted reproductive technologies an actual task is to improve current methods of sperm cryopreservation. We studied the morphological and functional states of the cryopreserved human sperm in normal and pathological conditions at different regimens of thawing. All samples were maintained above the mirror of liquid nitrogen with further heating of spermatozoa in a water bath (37, 50, 60, 70°C) or maintaining at room temperature until the liquid phase appearance. Morpho-functional state of sperm was estimated by their motility and viability. Assessment of sperm chromatin was carried out using acridine orange staining. It was found that a thawing regimen of sperm at 50°C (with pre-incubation of the samples in liquid nitrogen vapor at -150°C) after sperm cryopreservation by three-stage protocol effectively kept their motility without the changes of membrane integrity and nuclear chromatin state at normo- and asthenozoospermia. Thawing of sperm at room temperature under the same conditions was the most traumatic for human sperm both at normo- and asthenozoospermia.

Key words: human sperm, cryopreservation, thawing, motility, decondensation, chromatin.

Під час низькотемпературного консервування на рухливість, цілісність плазматичної мембрани та життєздатність сперматозоїдів впливають багато факторів, а саме: склад середовища криоконсервування, спосіб пакування зразків, час заморожування й відтавання [2, 5, 6, 20].

Традиційні режими відтавання не завжди дозволяють отримати високі показники збереженості спермій людини, тому існує потреба в розробці

During low-temperature preservation many factors such as composition of cryopreservation medium, the way of packaging the samples, freezing and thawing duration affect the motility, integrity of plasma membrane and viability of sperm [2, 14, 18, 19].

Traditional thawing regimens do not always allow to achieve high rates of human sperm survival, that is why there is a demand to develop new approaches to prevent mechanical damages of the cells, occurring

Відділ кріобіології системи репродукції, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+380 57) 373-31-19, факс: (+380 57) 373-30-84,
електронна пошта: lenoni@mail.ru

Надійшла 09.11.2015
Прийнята до друку 12.01.2016

Проблеми кріобіології і кріомедицини. – 2016. – Т. 26, №1. – С. 45–52.
© 2016 Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Department of Cryobiology of Reproduction System, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 3119, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: lenoni@mail.ru

Received November, 09, 2015
Accepted January, 12, 2016

Probl Cryobiol Cryomed 2016; 26(1): 45–52.
© 2016 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

нових підходів для уникнення механічних пошкоджень клітин, які виникають на етапі відтавання. Збільшення швидкості відігріву може бути перспективним для розробки оптимальних методів кріоконсервування. Проблема збереження якості спермій людини стосується еякулятів при патоспермії, оскільки в даному випадку мають місце як знижена рухливість, так і низьке відновлення клітин після кріоконсервування.

Швидкість відігріву суттєво впливає на життєздатність сперматозоїдів [17]. A.J. Dhami та співав. [10] запропонували режими відтавання сперми в соломинках, які відрізняються за температурою водяної бані та тривалістю нагріву. Загальноприйнятним методом відтавання сперми, замороженої в соломинках, незалежно від середовища кріоконсервування та швидкості охолодження, є відтавання на водяній бані при 33...35°C протягом 30–40 с [8, 16]. Було показано [7, 9, 12, 19], що більш висока температура нагріву (60...80°C) може додатково покращити рухливість спермій. Однак цих даних недостатньо для отримання повної картини впливу високих температур відігріву на спермії людини. Також є актуальною оптимізація способів відтавання клітин як в нормі, так і за умов патоспермії, коли кількість і рухливість сперматозоїдів суттєво зменшені, оскільки висока температура може інакше впливати на їх морфофункціональний стан, зокрема генетичний апарат клітин.

Мета роботи – дослідження впливу різних режимів відтавання на показники морфофункціонального стану кріоконсервованих спермій людини в нормі та при патології.

Матеріали та методи

У роботі було досліджено зразки еякулятів чоловіків-донорів у віці від 20 до 40 років із нормо- та астенозооспермією. Оцінку еякуляту проводили відповідно до рекомендацій ВООЗ [21]. Еякулят збирали методом мастурбації в стерильні чашки Петрі або бюкси й переносили в термостат (35...37°C) на 40–60 хв. У зразках сперми візуально оцінювали кількість спермій зі швидким та повільним прямолінійним рухом (фракція а+в), а також показник рухливості [1]. Концентрацію та рухливість спермій визначали під світловим мікроскопом «МБИ 15-У» («ЛОМО», Росія).

Зразки кріоконсервували за допомогою 4%-го розчину гліцерину («ПанЕко», Росія) і 20%-го бичачого сироваткового альбуміну («РАА», Австрія). Після 10–15-хвилинної еквілібрації з кріозахисним середовищем клітинну суспензію розфасували по 0,5–0,7 мл у полімерні трубочки довжиною 70–80 мм, зовнішнім діаметром 3,8 мм і товщиною стінок 0,12 мм, герметизували та маркували. Охолодження зразків проводили від 25 до

during thawing. The increase of warming rate may be a promising approach for the development of optimal cryopreservation methods. The problem of preserving the quality of human sperm is of special need for the pathospermic ejaculates, while the problems of both reduced motility and low cell recovery after cryopreservation are on the top.

The warming rate significantly affects the sperm viability [15]. A.J. Dhami *et al.* [6] suggested thawing regimens for sperm in straws, which differed by water bath temperature and heating duration. The conventional method of thawing the sperm frozen in straws, regardless of cryopreservation medium and cooling rate is thawing in water bath at 33...35°C for 30–40 sec [3, 13]. It was shown [1, 5, 9, 17] that a higher heating temperature (60...80°C) could improve the sperm motility. However, these data are insufficient to obtain a full insight of the effect of higher warming temperatures on human sperm. Optimization of thawing methods is also of importance not only for the normospermic cells but even more for pathospermic ones, where the number and motility of sperm are significantly reduced; moreover, a higher temperature may otherwise affect their morphological and functional state, including genetic apparatus of cells.

The research aim was to study the effect of different thawing regimens on the indices of morphological and functional state of cryopreserved human sperm under normal and pathological conditions.

Materials and methods

The research was performed in the samples of ejaculates of males aged 20 to 40 with normo- and asthenozoospermia. Ejaculate assessment was performed according to the WHO recommendations [21]. Ejaculate was collected by masturbation into a sterile Petri dishes or weighing bottles and transferred to the thermostat (35...37°C) for 40–60 min. The samples were visually assessed for the amount of sperm with fast and slow forward movement (fraction a+b) and the motility rate [4]. Sperm concentration and motility were determined using the light microscope MBI 15-U (LOMO, Russia).

The samples were cryopreserved using 4% glycerol (PanEko, Russia) solution supplemented with 20% bovine serum albumin (PAA, Austria). After 10–15-min equilibration with a cryoprotective medium the cell suspension samples were packed into 0.5–0.7 ml polymer tubes with a length of 70–80 mm, outer diameter of 3.8 mm and a wall thickness of 0.12 mm, sealed hermetically and marked. The samples were cooled from 25 down to 4°C by means of incubation for 30 min at 4°C, then were kept above a mirror of liquid nitrogen for 30 min. Thereafter the straws with the studied samples were immersed into liquid nitrogen (–196°C) and kept for 2 months on low-temperature bank.



4°C шляхом інкубування протягом 30 хв при 4°C, далі їх витримували над дзеркалом рідкого азоту протягом 30 хв. Після цього соломинки з дослідним матеріалом занурювали у рідкий азот (-196°C) та зберігали протягом 2-х місяців в умовах низькотемпературного сховища.

Перед розморожуванням усі зразки витримували над дзеркалом рідкого азоту протягом 15 хв для компенсації термопружної напруги [13, 14]. Подальший нагрів спермійів здійснювали на водяній бані за різних температур (контрольна група – 37°C, група 1 – 50°C, група 2 – 60°C, група 3 – 70°C) та за кімнатної температури (група 4) до появи рідкої фази.

Морфофункціональний стан спермійів оцінювали через 30 хв, 1, 2, 3 години.

Життєздатність спермійів підраховували в мазках, пофарбованих еозин-нігрозином [22], шляхом визначення процентного співвідношення живих і мертвих клітин; у препараті голівки живих спермійів залишалися незабарвленими, а голівки мертвих забарвлювалися еозином у рожевий колір. Досліджувані показники спермійів людини визначали в умовах різних режимів відтавання.

Оцінку стану хроматину спермійів проводили за допомогою акридину оранжевого (АО), який флуоресцює зеленим кольором при зв'язуванні з подвійним ланцюгом ДНК, і червоним, коли барвник зв'язується з одиничним ланцюгом деконденсованої ДНК. Для приготування мазків 1 мл сперми відмивали в 3–5 мл розчину Хенкса, двічі центрифугували при 834g протягом 5 хв. Відсоток спермійів із конденсованим хроматином у мазках визначали за допомогою флуоресцентного мікроскопа «Inverso Epi-Fluor» («CETI», Бельгія).

Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою «Excel 2007» («Microsoft», США).

Результати та їх обговорення

Кріоконсервування спермійів проводили за 3-етапною програмою шляхом охолодження їх від 25 до 4°C, подальшою витримкою у парах рідкого азоту та з наступним занурюванням. Цей спосіб дозволяє зберегти спермії людини в нормі та при астенозооспермії з високими показниками життєздатності та рухливості [5]. Загальноприйнятним способом деконсервування зразків спермійів людини є відтавання на водяній бані за температури 37°C, час відтавання в цьому випадку для зразків, що зберігались у рідкому азоті, складає 20 с. Під час застосування водяної бані при 50°C цей показник дорівнював 13 с, при 60°C – 10 с, при 70°C – 8 с.

Першим етапом роботи було дослідження впливу режиму відтавання на рухливість спермійів при нормозооспермії та патології. Отримані результати,

Before thawing all the samples were kept above a mirror of liquid nitrogen for 15 min to compensate thermostatic pressure [10, 11]. Later the sperm was warmed in water bath under different temperatures (control group – 37°C, group 1 – 50°C, group 2 – 60°C, group 3 – 70°C) and at room temperature (group 4) until appearance of liquid phase.

Morphological and functional state of the sperm was evaluated after 30 min, 1, 2 and 3 hrs.

The spermatozoa viability was evaluated in the smears stained with eosin-nigrosin [22], by determining the percentage of vital and dead cells. In the smear the vital sperm heads were unstained and the ones of dead sperm were pink stained. Investigated human sperm indices were determined under various thawing regimens.

The sperm chromatin state was assessed using acridine orange (AO), which fluoresces green when binding with double-chain of DNA and red when the dye binds to a single chain of decondensed DNA. To prepare the smears 1 ml of sperm was washed with 3–5 ml of Hanks' solution, twice centrifuged at 834g for 5 min. The calculation of stained sperm in the smears was done using Inverso Epi-Fluor fluorescent microscope (CETI, Belgium) and the value was expressed in percents.

The research results were statistically processed by Excel 2007 software (Microsoft, USA).

Results and discussion

Sperm were cryopreserved using 3-stage protocol: cooling from 25 down to 4°C, keeping in liquid nitrogen vapours and following plunging. This method allowed to preserve a high viability and motility in human sperm both at normo- and asthenozoospermia [14]. The conventional method of human sperm samples' thawing is warming in water bath at the temperature of 37°C, in this case thawing period of the samples in straws stored in liquid nitrogen made 20 sec. When applying the water bath of 50°C this index was 13 sec, at 60°C it was 10 sec and at 70°C this value made 8 sec.

The first stage of the research was to study the effect of thawing on sperm motility at normozoospermia and pathology. The findings presented in Fig. 1 have shown that after applying the conventional regimen of sperm samples thawing (control) the motility was (43.4 ± 1.2)%. Following 30 min post thaw in groups 1 (50°C), 2 (60°C) and 3 (70°C) the indices of motility were significantly higher relative to the control. During further observation (1–3 hrs) a reduction of this index was found in groups 2 (60°C) and 3 (70°C) down to the control values. Herewith the index of spermatozoa motility in the samples warmed at 50°C remained significantly higher comparing to the control and other experimental groups during the whole observation



представлені на рис. 1, свідчать, що після застосування стандартного режиму відтавання зразків спермійв (контроль) показник рухливості становив $(43,4 \pm 1,2)\%$. Після відтавання в групах 1 (50°C), 2 (60°C) та 3 (70°C) під час спостереження протягом 30 хв показники рухливості були статистично значно вищими відносно контролю. Протягом подальшого дослідження (1–3 години) спостерігалось зниження цього показника в групах 2 (60°C) та 3 (70°C) до рівня контрольних значень. При цьому показник рухливості сперматозоїдів у зразках спермійв, які були відігріті при 50°C , залишався значущо вищим протягом усього строку спостереження відносно контролю та інших експериментальних груп. У зразках, які відтавали за кімнатної температури, показник рухливості спермійв не відрізнявся від контрольних значень протягом усього експерименту.

Після відтавання зразків спермійв з астенозооспермією при 50°C протягом усього строку спостереження спостерігалось підвищення кількості клітин зі швидким та повільним прямолінійним рухом. Після 30 хв та 3 годин інкубації показник підвищувався відносно контролю на $(2,0 \pm 0,6)$ та $(2,2 \pm 0,6)\%$ спермійв фракції «a+v» відповідно.

Відсоток спермійв зі швидким та повільним прямолінійним рухом у зразках, відігрітих за кімнатної температури, залишався значущо нижчим відносно контролю та значень інших експериментальних груп протягом усього експерименту.

Наступним етапом роботи було дослідження впливу швидкості відігріву на життєздатність клітин у контролі та групах 1 (50°C), 2 (60°C), 3 (70°C) та 4 (кімнатна температура), яку визначали за допомогою забарвлення еозином. Отримані дані з визначення відсотка сперматозоїдів із неушкодженою мембраною після заморожування-відтавання наведено на рис. 3 та 4.

Життєздатність клітин у випадку нормозооспермії після заморожування та відтавання при 37°C становила $(91,3 \pm 2,3)$, астенозооспермії – $(81,6 \pm 2,2)\%$. Відтавання зразків групи 1 (50°C), 2 (60°C) та 3 (70°C) як при нормо-, так і астенозооспермії не змінювало кількості спермійв із ушкодженою мембраною в досліджених зразках.

Під час застосування режиму відтавання зразків за кімнатної температури спостерігалось збільшення кількості спермійв із профарбованими голівками на 8,6% відносно контролю, починаючи з першої години експерименту. Така тенденція відзначалася й у випадку астенозооспермії.

Отримані дані свідчать, що відтавання зразків на водяній бані за температури 50°C підвищує кількість активно-рухомих спермійв та не порушує цілісності мембрани голівки спермійв після замо-

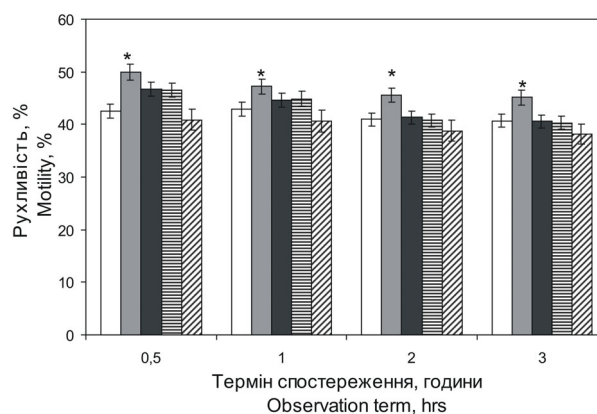


Рис. 1. Рухливість спермійв людини при нормозооспермії після криоконсервування та наступного відтавання: □ – контроль, 37°C ; ■ – відтавання при 60°C ; ■ – відтавання за кімнатної температури; ▨ – відтавання при 50°C ; ▩ – відтавання при 70°C ; * – статистично значуща різниця у порівнянні з контролем, $p \leq 0,005$.

Fig. 1. Motility of human sperm at normozoospermia after cryopreservation and following thawing: □ – control, 37°C ; ■ – thawing at 60°C ; ■ – thawing at room temperature; ▨ – thawing at 50°C ; ▩ – thawing at 70°C ; * – statistically significant difference if compared with the control, $p < 0.005$.

period. In the samples thawed at room temperature, the index of sperm motility did not differ from the control values throughout the experiment.

After thawing the sperm samples with asthenozoospermia at 50°C an increase in the number of cells with fast and slow forward movement was observed

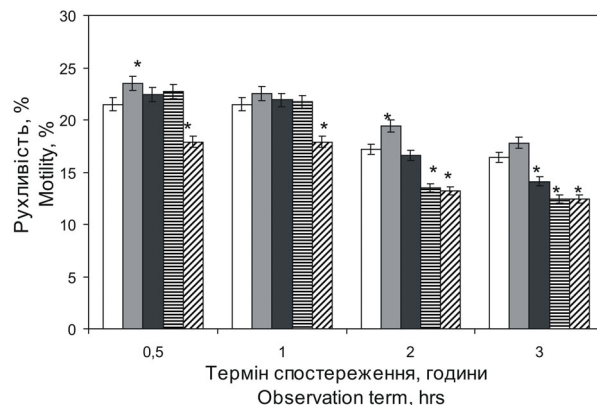


Рис. 2. Рухливість спермійв людини при астенозооспермії після криоконсервування та наступного відтавання: □ – контроль, 37°C ; ■ – відтавання при 60°C ; ■ – відтавання за кімнатної температури; ▨ – відтавання при 50°C ; ▩ – відтавання при 70°C ; * – статистично значуща різниця у порівнянні з контролем, $p \leq 0,005$.

Fig. 2. Motility of human sperm at asthenozoospermia after cryopreservation and following thawing: □ – control, 37°C ; ■ – thawing at 60°C ; ■ – thawing at room temperature; ▨ – thawing at 50°C ; ▩ – thawing at 70°C ; * – statistically significant difference if compared with the control, $p < 0.005$.



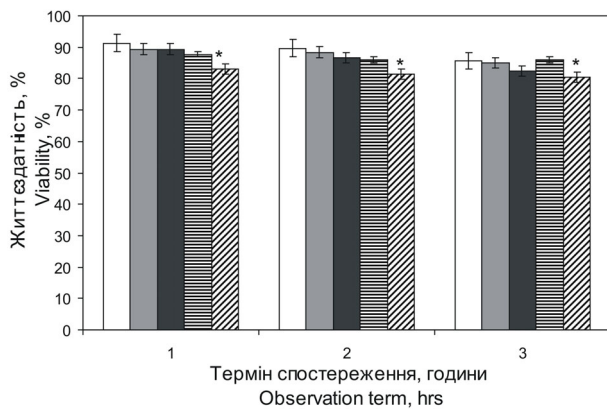


Рис. 3. Життєздатність спермій людини при нормозооспермії після кріоконсервування та наступного відтавання: □ – контроль, 37°C; ■ – відтавання при 60°C; ■ – відтавання за кімнатної температури; □ – відтавання при 50°C; ▨ – відтавання при 70°C; * – статистично значуща різниця у порівнянні з контролем, $p \leq 0,005$.

Fig. 3. Viability of human sperm at normozoospermia after cryopreservation and following thawing: □ – control, 37°C; ■ – thawing at 60°C; ■ – thawing at room temperature; □ – thawing at 50°C; ▨ – thawing at 70°C; * – statistically significant difference if compared with the control, $p < 0.005$.

рожування-відтавання в порівнянні з цими показниками у групі контролю у випадку нормо- та астенозооспермії. У той же час застосування режимів відтавання 60 та 70°C знижує показники рухливості спермій, але не впливає на життєздатність клітин як при нормо-, так і астенозооспермії. Повільний режим відтавання за кімнатної температури є найбільш травматичним для спермій людини як у нормі, так і з патологією.

Для дослідження впливу режимів відтавання на стан ядерного хроматину спермій була проведена серія експериментів із використанням люмінесцентного барвника АО, флуорохром якого вбудується у подвійний ланцюг ДНК як мономер, в одинарну нитку – як агрегат. Мономерний АО у непошкодженій ДНК флуоресцює зеленим кольором, у той час як агрегований АО – червоним [4].

У зразках із нормо- та астенозооспермією після кріоконсервування кількість спермій із непошкодженою ДНК (зелене світіння) складає в контрольній групі ($83,5 \pm 5,0$) і ($76,0 \pm 3,0$)% відповідно (таблиця). Використання режимів відтавання при 50, 60 та 70°C не призводило до значущих змін дослідженого показника у кріоконсервованих зразках спермій при нормо- та астенозооспермії відносно контролю. Після відтавання зразків спермій за кімнатної температури відзначалось значне зменшення кількості клітин із конденсованим хроматином, що вказує на підвищення відсотка спермій із порушенням генетичного апарату на 22%. О.А. Воробйова та співавт. [3] у роботі використо-

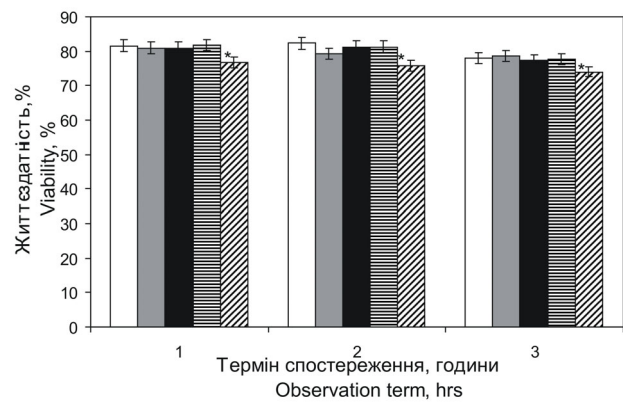


Рис. 4. Життєздатність спермій людини при астенозооспермії після кріоконсервування та наступного відтавання: □ – контроль, 37°C; ■ – відтавання при 60°C; ■ – відтавання за кімнатної температури; □ – відтавання при 50°C; ▨ – відтавання при 70°C; * – статистично значуща різниця у порівнянні з контролем, $p \leq 0,005$.

Fig. 4. Viability of human sperm at asthenozoospermia after cryopreservation and following thawing: □ – control, 37°C; ■ – thawing at 60°C; ■ – thawing at room temperature; □ – thawing at 50°C; ▨ – thawing at 70°C; * – statistically significant difference if compared with the control, $p < 0.005$.

through the observation time. After 30 min and 3 hrs of incubation the index increased vs. the control by (2.0 ± 0.6) and (2.2 ± 0.6)% as for the 'a+b' sperm fraction, respectively.

The percentage of sperm with fast and slow forward movement in the samples warmed at room temperature remained significantly lower vs. the control and the values of other experimental groups through the experiment.

The next stage was to study the effect of warming rate on cell viability in the control and in groups 1 (50°C), 2 (60°C) and 3 (70°C) and 4 (room temperature), assessed by eosin staining. The data on determining the content of sperm with intact membrane after freeze-thawing are shown in Fig. 3 and 4.

Cell viability at normozoospermia after freezing and thawing at 37°C was (91.3 ± 2.3) and at asthenozoospermia it made (81.6 ± 2.2)%. Thawing of the samples of the groups 1 (50°C), 2 (60°C) and 3 (70°C) both at normo- and asthenozoospermia did not alter the number of sperm with damaged membrane in the investigated samples.

Applying thawing regimen of samples at room temperature resulted in an increase in sperm amount with the stained heads by 8.6% compared to the control after the first hour of the experiment. This tendency was observed at asthenozoospermia as well.

These data suggest that the thawing of samples in water bath at 50°C increases the amount of actively moving sperm and does not affect the integrity of sperm head membrane after freeze-thawing vs. the

Стан нуклеарного хроматину спермій людини після
кріоконсервування та наступного відтавання
State of nuclear chromatin of human sperm
after cryopreservation and following thawing

Група Group	Нормозооспермія Normozoospermy	Астенозооспермія Asthenozoospermy
Контроль (37°C) Control (37°C)	83,5 ± 1,3	76 ± 1,1
Група 1 (50°C) Group 1 (37°C)	79,1 ± 1,4	77,5 ± 1,2
Група 2 (60°C) Group 2 (60°C)	79,8 ± 1,5	76,3 ± 1,3
Група 3 (70°C) Group 3 (70°C)	84,5 ± 1,3	81,0 ± 1,1
Група 4 (кімнатна температура) Group 4 (room temperature)	62,1 ± 1,5*	62,8 ± 1,1*

Примітка: * – статистично значуща різниця у порівнянні з контролем, $p \leq 0,005$.

Note: * – the differences are statistically significant if compared with the control, $p \leq 0.05$.

вують стан нуклеарного хроматину спермій як якісний показник запліднюючої здатності кріоконсервованих чоловічих гамет.

Відомо, що у випадку повільного відтавання заморожених клітин відбуваються значні механічні пошкодження структури клітин, у тому числі й при рекристалізації як внутрішньоклітинного, так і позаклітинного льоду [18]. Також під час повільного відтавання спермій відбувається включення частини рідкої фази до кристалічної структури, що супроводжується підвищенням концентрації позаклітинних розчинів. У зоні фазових перетворень спостерігається рекристалізація, яку відносять до факторів пошкодження. У різних місцях зразка клітини відіграються з різною швидкістю. Всі клітини чутливі до швидкості нагріву на етапі відтавання. Ця залежність може посилюватися у присутності кріопротекторів [11, 15], оскільки введення кріозахисних речовин є причиною додаткових фазових перетворень.

За умов підвищення швидкості нагріву можна уникнути вище зазначених пошкоджень. Для отримання високих показників морфологічного стану клітин після кріоконсервування важливо дотримуватися ефективного співвідношення режимів охолодження та нагріву. Тому в дослідженнях під час використання 3-етапної програми заморожування з інкубацією в парах рідкого азоту перед безпосереднім охолодженням до -196°C ми застосували режим відтавання зразків спермій на водяній бані з попередньою інкубацією їх у парах рідкого азоту.

indices in the control group at normo- and asthenozoospermia. At the same time the use of thawing regimens at 60 and 70°C reduces sperm motility indices, but does not affect the cell viability both at normo- and asthenozoospermia. Slow thawing regimen at room temperature is the most traumatic for human sperm not only for normo- but pathospermic cells as well.

To investigate the effect of thawing regimen on the state of sperm nuclear chromatin we carried out the series of experiments using AO fluorescent dye, fluorochrome of which is intercalated into DNA double chain as monomer, and as an aggregate into a single-stranded one. Monomeric AO in undamaged DNA fluoresces green, while the aggregated AO has red fluorescence [8].

After cryopreservation in the samples with normo- and asthenozoospermia the amount of spermatozoa with intact DNA (green fluorescence) in the control group was (83.5 ± 5) and $(76.0 \pm 3)\%$, respectively (Table). Use of thawing regimens at 50, 60 and 70°C did not lead to significant changes of the studied index in cryopreserved sperm samples both at normo- and asthenozoospermia relative to the control. After thawing the sperm samples at room temperature a significant reduction in the number of cells with condensed chromatin was revealed, which indicated the rise in content of the sperm with impaired genetic apparatus by 22%. O.A. Vorobyova *et al.* [20] reported the state of nuclear sperm chromatin as a proper qualitative indicator of fertilizing ability of cryopreserved male gametes.

It is known that slow thawing of the frozen cells results in significant mechanical damages of cell structure, occurring during re-crystallization of both intracellular and extracellular ice [16]. Moreover, the slow sperm thawing is accompanied by an inclusion of a liquid phase to crystalline structures, resulting in increasing concentrations of extracellular fluids. In the area of phase transitions a re-crystallization is observed, which is one of the damaging factors. Different parts of the sample are characterized with various rates of cells warming. All the cells are sensitive to heating rate during thawing. This dependence can be even increased in the presence of some cryoprotectants [7, 12], since the introduction of cryoprotective agents is a cause of additional phase transformations.

Increasing of the heating rate could facilitate the avoidance of above mentioned damages. To obtain high indices of morphological and functional state of the



Висновки

Таким чином, режим відтавання при 50°C дозволяє ефективно зберігати морфофункціональні властивості спермій людини (рухливість клітин без зміни цілісності мембрани та стану нуклеарного хроматину) у випадку як нормо-, так і астенозооспермії. Режим відтавання за кімнатної температури є найбільш травматичним для спермій людини при нормо- та патоспермії.

Література

1. Брагина Е.Е., Абдумаликова Р.А. Руководство по сперматологии. – М.: СОРЕК–полиграфия. – 2002. – 93 с.
2. Волкова Н.О., Павлович О.В., Гапон Г.О., Ніколов О.Т. Стан деконденсації хроматину в сперміях людини після криоконсервування та впливу електромагнітного випромінювання міліметрового діапазону // Біофізичний вісник. – 2013. – Т. 30, №2. – С. 87–94.
3. Воробьева О.А., Воскресенская А.В., Одинцов А.А. и др. Мужское бесплодие и нарушение структурной организации хроматина сперматозоидов. Существует ли связь? // Проблемы репродуктологии. – 2005. – №6. – С. 56–62.
4. Дунаевская А.В., Крамар М.И. Изменение состояния нуклеарного хроматина спермиев человека в процессе криоконсервации // Медицина сегодня и завтра. – 2000. – №3. – С. 13–15.
5. Павлович О.В. Аналіз дії фулеренів на спермії людини до та після криоконсервування // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – Т. 3, Вип. 3, №112. – С. 178–182.
6. Ansari M.S., Rakha B.A., Andrabi S.M. et al. Effect of straw size and thawing time on quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) semen // *Reprod. Biol.* – 2011. – Vol. 11, №1. – P. 49–54.
7. Ahmad K. Effect of thaw rates on survival of buffalo spermatozoa frozen straws // *J. Dairy Sci.* – 1984. – Vol. 67, №7. – P. 1535–1538.
8. Barth A.D., Bowman P.A. Determination of the best practical method of thawing bovine semen // *Can. Vet. J.* – 1988. – Vol. 29, №4. – P. 366–369.
9. Dhami A.J., Sahni K.L., Mohan G. Effect of various cooling rates (from 30 degrees C to 5 degrees C) and thawing temperatures on the deep-freezing of *Bos Taurus* and *Bos Bubalis* semen // *Theriogenology*. – 1992. – Vol. 38, №3. – P. 565–574.
10. Dhami A.J., Sahni K.L., Mohan G. et al. Effects of different variables on the freezability, post-thaw longevity and fertility of buffalo spermatozoa in the tropics // *Theriogenology*. – 1996. – Vol. 46, №1. – P. 109–120.
11. Dong Q., Hill D., VandeVoort C.A. Interactions among pre-cooling, cryoprotectant, cooling, and thawing for sperm cryopreservation in rhesus monkeys // *Cryobiology*. – 2009. – Vol. 59, №3. – P. 268–274.
12. Evenson D., Jost L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment // *Methods in Cell Sci.* – 2000. – Vol. 22, №2–3. – P. 169–189.
13. Gurina T.M., Pakhomov A.V., Kyrlyuk A.L. et al. Development of a cryopreservation protocol for testicular interstitial cells with the account of temperature intervals for controlled cooling below –60°C // *Cryobiology*. – 2011. – Vol. 62, №2. – P. 107–114.
14. Gurina T.M., Pakhomov A.V., Polyakova A.L. et al. The development of the cell cryopreservation protocol with controlled rate thawing. *Cell Tissue Bank* 2015; Sept 18: 1–14 [Epub ahead of print].

cells after cryopreservation it is important to maintain the effective ratio of cooling and heating regimens. Our studies utilized the 3-stage freezing protocol with an incubation in liquid nitrogen vapours prior to cooling down to –196°C and therefore the thawing regimen of sperm samples in water bath was advanced by an incubation in liquid nitrogen vapours.

Conclusions

Thus, thawing regimen at 50°C allows to preserve effectively the morphological and functional properties of human sperm (cell motility without changes in cell membrane integrity and state of nuclear chromatin) at normo- and asthenozoospermia. Thawing regimen at room temperature is the most traumatic for human sperm at normo- and pathospermia.

References

1. Ahmad K. Effect of thaw rates on survival of buffalo spermatozoa frozen straws. *J Dairy Sci* 1984; 67(7): 1535–1538.
2. Ansari M.S., Rakha B.A., Andrabi S.M. et al. Effect of straw size and thawing time on quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Reprod Biol* 2011; 11(1): 49–54.
3. Barth A.D., Bowman P.A. Determination of the best practical method of thawing bovine semen. *Can Vet J* 1988; 29(4): 366–369.
4. Bragina E.E., Abdumalikova R.A. Guide of spermatology. Moscow: SOREK-poligrafia 2002.
5. Dhami A.J., Sahni K.L., Mohan G. Effect of various cooling rates (from 30 degrees C to 5 degrees C) and thawing temperatures on the deep-freezing of *Bos Taurus* and *Bos Bubalis* semen. *Theriogenology* 1992; 38(3): 565–574.
6. Dhami A.J., Sahni K.L., Mohan G. et al. Effects of different variables on the freezability, post-thaw longevity and fertility of buffalo spermatozoa in the tropics. *Theriogenology* 1996; 46(1): 109–120.
7. Dong Q., Hill D., VandeVoort C.A. Interactions among pre-cooling, cryoprotectant, cooling, and thawing for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. *Cryobiology* 2009; 59(3): 268–274.
8. Dunayevskaya A.V., Kramar M.I. Changing the status of the nuclear chromatin of human sperm in the process of cryopreservation. *Medicine Today and Tomorrow* 2000; 3: 13–15.
9. Evenson D., Jost L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci* 2000; 22(2–3): 169–189.
10. Gurina T.M., Pakhomov A.V., Kyrlyuk A.L. et al. Development of a cryopreservation protocol for testicular interstitial cells with the account of temperature intervals for controlled cooling below –60°C. *Cryobiology* 2011; 62(2): 107–114.
11. Gurina T.M., Pakhomov A.V., Polyakova A.L. et al. The development of the cell cryopreservation protocol with controlled rate thawing. *Cell Tissue Bank* 2015; Sept 18: 1–14 [Epub ahead of print].
12. Leibo S.P., Farrant J., Mazur P. et al. Effects of freezing on marrow stem cell suspensions: interactions of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose, or glycerol. *Cryobiology* 1970; 6(4): 315–332.
13. Narasimha Rao A.V., Haranath G.B., Soma Sekharam G. et al. Effect of thaw rates on motility, survival and acrosomal

15. Leibo S.P., Farrant J., Mazur P. et al. Effects of freezing on marrow stem cell suspensions: interactions of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose, or glycerol // *Cryobiology*. – 1970. – Vol. 6, №4. – P. 315–332.
16. Narasimha Rao A.V., Haranath G.B., Soma Sekharam G. et al. Effect of thaw rates on motility, survival and acrosomal integrity of buffalo spermatozoa frozen in medium French straws // *Anim. Reprod. Sci.* – 1986. – Vol. 12, №2. – P. 123–129.
17. Robbins R.K., Saacke R.G., Chandler P.T. Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in French straws // *J. Anim. Sci.* – 1976. – Vol. 42, №1. – P. 145–154.
18. Seki S., Mazur P. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure // *Cryobiology*. – 2009. – Vol. 59, №1. – P. 75–82.
19. Senger P.L. Handling frozen bovine semen – Factors which influence viability and fertility // *Theriogenology*. – 1980. – Vol. 13, №1. – P. 51–62.
20. Volkova N.A., Pavlovich E.V., Gapon A.A., Nikolov O.T. Effects of millimeter-wave electromagnetic exposure on the morphology and function of human cryopreserved spermatozoa // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2014. – Vol. 157, №5. – P. 574–576.
21. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen fifth edition. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. – 2010. – 287 p.
22. World Health Organization Laboratory manual examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge: The Press Syndicate of the University of Cambridge, 1997. – 138 p.
- integrity of buffalo spermatozoa frozen in medium. *French straws Anim Reprod Sci* 1986; 12(2): 123–129.
14. Pavlovich E.V. Analysis of fullerene's action on human sperm before and after cryopreservation. *Bulletin of Problems of Biology and Medicine* 2014; 3(112): 178–182.
15. Robbins R.K., Saacke R.G., Chandler P.T. Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in French straws. *J Anim Sci* 1976; 42(1): 145–154.
16. Seki S., Mazur P. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. *Cryobiology* 2009; 59(1): 75–82.
17. Senger P.L. Handling frozen bovine semen – factors which influence viability and fertility. *Theriogenology* 1980; 13(1): 51–62.
18. Volkova N.A., Pavlovich E.V., Gapon A.A. et al. Decondensation of chromatin state in human sperm cells after cryopreservation and electromagnetic irradiation of millimeter range. *Biophysical Bulletin* 2013; 30(2): 87–94.
19. Volkova N.A., Pavlovich E.V., Gapon A.A., Nikolov O.T. Effects of millimeter-wave electromagnetic exposure on the morphology and function of human cryopreserved spermatozoa. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2014; 157(5): 574–576.
20. Vorobieva O.A., Voskresenskaya A.V., Odintsov A.A. et al. Male infertility and impaired structural organization of spermatozoa chromatin. Is there any connection? *Problems of Reproduction* 2005; 6: 56–62.
21. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen fifth edition. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research, 2010.
22. World Health Organization Laboratory manual examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge: The Press Syndicate of the University of Cambridge, 1997.

