

Морфологические и функциональные характеристики спермиев человека после криоконсервирования в условиях сверхбыстрого охлаждения

В.Е. ЧАДАЕВ, И.Н. КУЧКОВ, И.В. ЧЕРКАШИНА, К.А. ГОЛЬЦЕВ, И.В. ДОБРУНОВА
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Morphological and functional characteristics of human spermatozoa after cryopreservation under ultrarapid cooling

V.YE. CHADAEV, I.N. KUCHKOV, I.V. CHERKASHINA, K.A. GOLTSEV, I.V. DOBRUNOVA
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Проведено сравнительное исследование основных морфологических и иммунологических тестов для определения функциональных характеристик спермиев человека при криоконсервировании в условиях сверхбыстрого охлаждения. Показано, что режим замораживания приводит к перераспределению процента патологических спермиев, увеличивая количество форм клеток с повреждением хвоста. Отмечена положительная корреляция тестов Курцрока-Миллера и SpermMar.

Ключевые слова: спермии, морфология, тест SpermMar, тест Курцрока-Миллера, сверхбыстрое охлаждение.

Проведено порівняльне дослідження основних морфологічних і імунологічних тестів для визначення функціональних характеристик спермій людини при криоконсервуванні в умовах надшвидкого охолодження. Показано, що режим заморожування приводить до перерозподілу відсотка патологічних спермій, збільшуючи кількість форм клітин з ушкодженням хвоста. Відзначено позитивну кореляцію тестів Курцрока-Міллера і SpermMar.

Ключові слова: спермії, морфологія, тест SpermMar, тест Курцрока-Міллера, надшвидке охолодження.

Comparative study of key morphological and immunological tests to find functional characteristics of human sperm during cryopreservation under ultrarapid cooling conditions was performed. Freezing regimen was shown to result in re-distribution of the percentage of pathological spermatozoa, by increasing the number of cell forms with a tail damage. There was noted a positive correlation of Kurzrock-Miller and SpermMar tests.

Key-words: sperm, morphology, SpermMar test, ultrarapid cooling, Kurzrock-Miller test.

В начале 90-х годов оптимизация способов криоконсервирования репродуктивных клеток млекопитающих, в том числе и человека, стала одной из актуальных проблем криобиологии. Существующие способы замораживания биобъектов, в частности репродуктивных клеток, базируются на введении в биосистему одного из криопротекторов высокой концентрации [1]. В экспериментальной и прикладной криобиологии используются сложные, дорогостоящие электронные замораживатели, способные осуществлять с большой точностью необходимые программы снижения температуры. При достоинствах этих приборов их программы криоконсервирования включают этап, при котором происходит фазовый переход в лёд. Сочетание физических и химических факторов воздействия на спермии обуславливает криозащиту за счёт постепенного обезвоживания клеток, буферных свойств криоконсерванта в отношении “эффекта раствора” и действия криопротектора на коллигативной основе, что не позволяет добиться высокой и стабильной степени сохранности замороженно-оттаянных клеток из-за

Адрес для корреспонденции: Кучков И.Н., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-19, факс: +38 (057) 373-31-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

In early 90th the optimization of cryopreservation ways for reproductive cells of mammals including human ones became one of cryobiological actual tasks. Existing ways for freezing biological objects in particular reproductive cells are based on introduction of a cryoprotectant under high concentration into a biological system [1]. In experimental and applied cryobiology there are used complicated expensive electron freezers capable of realizing necessary programs with a high accuracy to reduce temperature. With advantages of these devices their cryopreservation programs include the stage at which phase transition into ice occurs. Combined effect of physical and chemical factors on sperm stipulates cryoprotection due to gradual rehydration of cells, buffer properties of cryopreservative regarding “solution effect” and the influence of cryoprotectant on colligative base, that does not enable to approaching high and stable degree of frozen-thawed cells because of negative factors affecting them durably and intensively.

Cryopreservation under conditions of ultrarapid cooling of cell suspension may serve as an alternative to existing methods for human sperm freezing. This

Address for correspondence: Kuchkov I.N., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3119, fax: +380 57 373 3184, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

длительно и интенсивно действующих на клетки негативных факторов.

Альтернативой существующим методам замораживания спермиев человека может служить метод криоконсервирования в условиях сверхбыстрого охлаждения клеточной суспензии. Существенным преимуществом этого метода, наряду с высоким процентом подвижности клеток после отогрева, является возможность замораживания эякулятов как в норме, так и при патологии. Наиболее распространённая патология эякулята – олигоастеноспермия, т.е. снижение количества спермиев и изменение их кинетических характеристик.

Несмотря на перечисленные негативные факторы, для криоконсервирования спермиев человека используют различные процессы замораживания, автоматизированные с помощью программных замораживателей, коммерческие среды для криоконсервирования гамет и реабилитации спермиев после отогрева.

Обзорный микроскопический анализ отогретого образца не позволяет получить полную информацию о его качестве. Наиболее информативными являются исследования морфологических характеристик спермиев, кроме определения их подвижности. Морфология сперматозоидов – параметр, достоверно влияющий на частоту оплодотворения и частоту наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий. Определение морфологии по строгим критериям является международным стандартом в оценке качества спермы.

Важным свойством спермиев следует считать их способность проникать в цервикальную слизь (тест Курцрока-Миллера). Также имеет большое значение MAR-тест (mixed antiglobulin reaction, Juger, 1978), расширяющий возможности теста Курцрока-Миллера. MAR-тест имеет приемлемую чувствительность, специфичность и диагностическую значимость. По данным современной статистики в основе 10% причин мужского бесплодия лежит иммунологический фактор.

В работе изучены показатели отогретой суспензии спермиев человека, замороженной в условиях сверхбыстрого охлаждения.

Материалы и методы

Исследование было проведено с использованием донорской спермы с показателями эякулята, представленными в таблице.

Морфологию спермиев исследовали с помощью набора красителей “Spermac Stein” (FertiPro, Бельгия). Процесс окраски включает фиксацию и поочерёдное прокрашивание мазка спермы тремя красителями, которые специфически связывают

method significant advantage together with a high percentage of cell motility after thawing is the possibility to freeze ejaculates both in norm an pathology. The most spread pathology of ejaculate is oligoasthenospermia, i.e. reduction of the spermatozoa number and change of their kinetic characteristics.

Despite listed negative factors to cryopreserve human sperm there are used various freezing procedures, which are automated due to programmable freezers, commercial cryopreservation media for gametes and spermatozoa rehabilitation after thawing.

Microscopic analytical observation of thawed sample does not allow the obtaining of a complete information about its quality. The most informative studies are the ones of sperm morphological characteristics in addition to their motility examining. Spermatozoa morphology is a parameter statistically and significantly affecting fertilization rate and the one of pregnancy onset in the programs of auxiliary reproductive technologies. Determination of morphology on strict criteria is an international standard when assessing sperm quality.

Sperm ability to penetrate into cervical mucus should be referred as an important property (Kurzrock-Miller test). MAR-test is also of great value (mixed antiglobulin reaction, Juger, 1978), extending the opportunity of Kurzrock-Miller test. MAR-test has a suitable sensitivity, specificity and diagnostic value. On contemporary statistical data 10% male infertility is caused by immunological factor.

In the paper there were studied the indices of warmed suspension of human sperm frozen under ultrarapid cooling.

Materials and methods

Research was performed using donor's sperm with the ejaculate indices represented in the Table.

Sperm morphology was investigated using “Spermac Stein” dyes (FertiPro, Belgium). The staining method comprises fixation and sequential staining of smears with three dyes, specifically binding different spermatozoa sites. Antiglobulin reaction was observed using SperMar test kit (FertiPro, Belgium). The reaction essence is binding of sperm with conjugate-antiserum (anti-IgG) in presence of the indicator, latex particles with IgG. MAR-test results were assessed on the criteria of presence of antisperm antibodies in sperm: positive – more than 50%, negative – up to 40%, problematic – 40-50%.

Sperm samples to be frozen were ultrarapidly cooled using the method designed at the Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine [2]. Ultrarapid cooling rates were reached by plunging the containers into amorphous oxide powder cooled down the temperature of liquid nitrogen. Compositional

Показатели эякулята при нормоспермии, используемые в этой работе (по ВОЗ, 2002 г.)
Ejaculate index at normospermia (according to the WHO, 2002)

Показатель эякулята Ejaculate index		Значение нормы эякулята Ejaculate norm values
Объем Volume		2–6 мл 2–6 ml
pH pH		7,2–8,0
Время разжижения Liquidification time		20–40 мин 20–40 min
Концентрация спермиев Spermatozoa concentration		20 млн и более 20 mln and more
Количество спермиев в эякуляте Number of spermatozoa in ejaculate		40 млн и более 40 mln and more
Подвижность спермиев в группах Spermatozoa motility in group	а) с быстрым поступательным движением (активно-подвижные) a) with rapid forward movement (actively motile)	20–25%
	б) медленным разнонаправленным движением (подвижные) b) slow with multidirectional movement (motile)	25% и более 25% and more
	в) колебательным движением (местнокачающиеся) c) locally swinging	
Жизнеспособность спермиев Viability of spermatozoa		75% и более 75% and more
Нормальные (по морфологии) спермии Normal spermatozoa (on morphology)		30% и более 30% and more
Индекс тератозооспермии (индекс множественных дефектов) Teratozoospermia index (index of multiple defects)		Менее 1,6 Less 1,6
Лейкоциты и клетки сперматогенеза "круглые клетки" Leukocytes and spermatogenesis cells "round" cells		Не более 6 млн в 1 мл No more than 6 mln /ml
Агглютинаты (количество, характер) Agglutinates (number, character)		Не более 3-х в поле зрения Not more than 3 within vision field

ся с разными участками спермия. Антиглобулиновую реакцию наблюдали, используя набор Sperm-Mar test (FertiPro, Бельгия). В основе метода лежит связывание спермиев с конъюгатом-антисывороткой (анти-IgG) в присутствии индикатора – частиц латекса с IgG. Оценка результатов MAR-теста происходила по критериям наличия у спермиев антиспермальных антител: более 50% – положительный, до 40% – отрицательный, 40-50% – сомнительный (рис. 1).

Сверхбыстрое охлаждение замораживаемых образцов спермы проводили с помощью метода, разработанного сотрудниками ИПКиК НАН Украины [2]. Сверхвысокие скорости охлаждения достигались погружением контейнеров в охлажденный до температуры жидкого азота порошок аморфного оксида.

Композиционный криоконсервант содержал глицерин, цитратный буфер с pH 7,4, глюкозу и другие компоненты. Замораживание осуществляли в полипропиленовых стерильных криопробирках фирмы "Corning" объемом 1 мл. При этом оптимум сохранности спермиев находился в

cryopreservative contained glycerol, citrate buffer (pH 7.4), glucose and other components. Freezing was made in 1 ml polypropylene sterile cryovials (Corning). The optimum of integrity in this case for sperm was found within the range 3000-5000C/min. Samples were thawed up to disappearance of solid phase, placing containers for 3-5 min on water bath at 40°C. In the researches there was used light microscope (Olympus, Japan).

Results and Discussion

Sperm cryopreservation under ultrarapid freezing enables to obtain a high post-thaw motility of spermatozoa [3]. Mammalian spermatozoa are highly polarised cells having five morphologically differing compartments: anterior head part (acrosomal segment), equatorial segment, posterior head part (post-acrosomal segment), middle part (neck) and tail [4]. Each part plays a certain role during fertilisation.

The researches showed (Fig. 2) that after cryopreservation the number of normal spermatozoa reduced together with a rise in pathological forms among those the cells with tail pathology dominated.

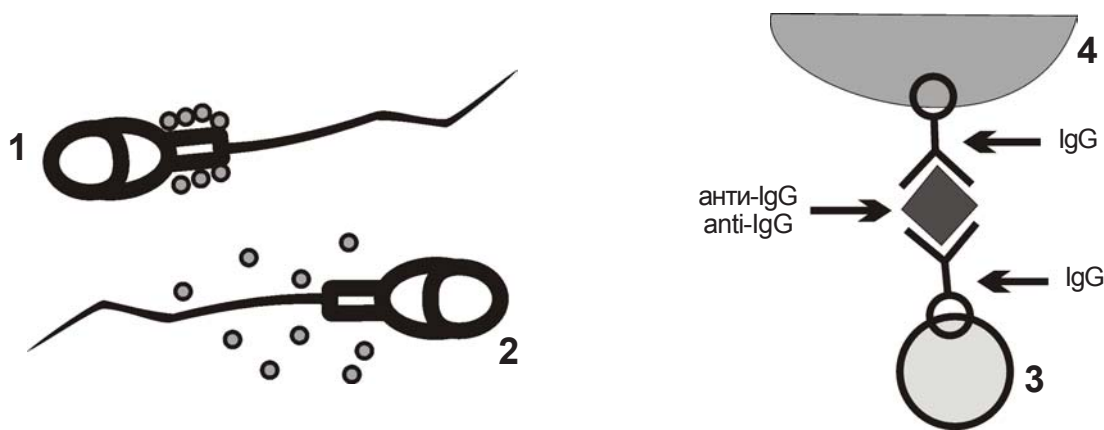


Рис.1. Взаимодействие частиц латекса со спермиями при проведении MAR-теста: 1 – MAR-тест положительный; 2 – MAR-тест отрицательный; 3 – частица латекса с иммобилизованным IgG; 4 – поверхность спермия.

Fig. 1. Interaction of latex particles with spermatozoa during MAR-test: 1 – MAR-positive test; 2 – MAR-negative test; 3 – latex particle with immobilized IgG; 4 – spermatozoa surface.

диапазоне 3000-5000°С/мин. Образцы размораживали до исчезновения твёрдой фазы, помещая контейнеры на 3-5 мин в водяную баню при 40°С. В исследованиях использовался световой микроскоп “OLYMPUS” (Япония).

Результаты и обсуждения

Криоконсервирование спермиев в условиях сверхбыстрого охлаждения позволяет добиться высокой подвижности спермиев после отогрева [3]. Сперматозоиды млекопитающих – высокополяризованные клетки, имеющие пять морфологически отличающихся отделов: передняя часть головки (акросомальный сегмент), экваториальный сегмент, задняя часть головки (постакросомальный сегмент), средняя часть (шейка) и хвост [4]. Каждый отдел играет определенную роль в процессе оплодотворения.

Исследования показали (рис. 2), что после криоконсервирования количество нормальных спермиев снижается вместе с повышением патологических форм, среди которых доминируют клетки с патологией хвоста. Относительное постоянство количества повреждений в средней части спермиев, в которой сосредоточен митохондриальный аппарат, может свидетельствовать о снижении подвижности клеток после отогрева именно из-за нарушений морфологии хвоста. Логично предположить, что увеличение количества клеток со смешанной патологией происходит при добавлении в эту группу клеток из других групп патологий. Таким образом, информативность процента спермиев со смешанной патологией актуальна лишь до криоконсервирования. Отмеченное увеличение патологии головки в основном связано с повреждением акросомы как наиболее криолабильной структуры спермия. Нами была отмечена частичная утрата клетками этой

Relative consistency of the number of damages in a middle part of spermatozoa, where mitochondrial apparatus is concentrated, may testify to a decrease in cell motility after thawing just due to impairments in tail morphology. There is logic in supposing that a rise in number of cells with mixed pathology occurs when adding to this group of the cells from those with other pathologies. This informativity of spermatozoa percentage with mixed pathology is actual only before cryopreservation. Noted increase in head pathology is mainly related to acrosome damages the most cryolabile structure of spermatozoa. We have noticed a partial

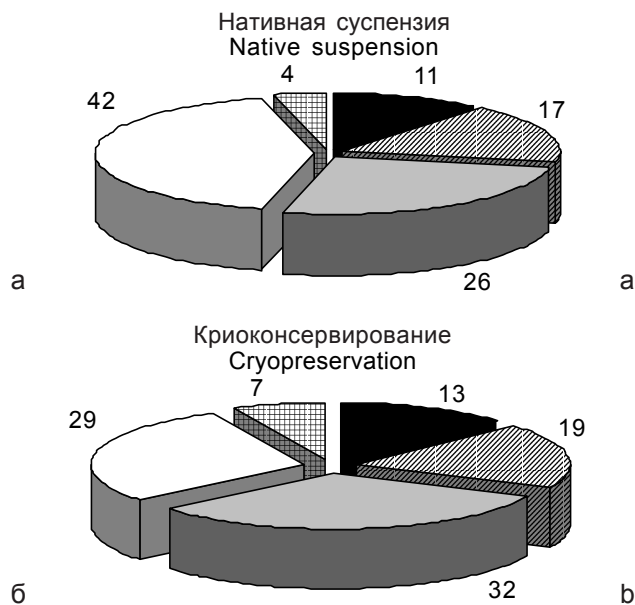


Рис. 2. Процентное соотношение морфологических форм спермиев с различными участками повреждения клетки до (а) и после (б) криоконсервирования: ■ – головка; ▨ – шейка; ▩ – хвост; □ – норма; ▤ – смешанная патология.

Fig. 2. Percentage of morphological spermatozoa forms with different sites of cell damage before (a) and after (b) cryopreservation: ■ – head; ▨ – neck; ▩ – tail; □ – norm; ▤ – mixed pathology.

органеллы в процессе замораживания-отогрева, что вместе с низким процентом изменения в этой группе патологий может свидетельствовать об эффективной криозащите. Следует также отметить, что увеличение процента смешанной патологии необязательно должно происходить из группы нормальных клеток, так как трудно предположить нарушение в процессе криоконсервирования всех морфологических отделов спермия. Следовательно, эта группа после отогрева, как мы полагаем, также увеличивается за счёт криповреждения спермиев из других патологических групп.

Изучение спермиев человека до и после криоконсервирования по строгим морфологическим критериям позволяет установить реальные последствия криповреждения клеточной суспензии и возможность дальнейшего использования отогретого материала во вспомогательных репродуктивных технологиях.

Сперма обладает сложным антигенным составом. Антигены спермиев (более 30) являются чужеродными для собственного организма. Поверхностные антигены представлены, в частности, антигенами групп крови ABO, Rh-Hr, MNS, P, антигенами гистосовместимости HLA, в том числе локусов D и Dr.

Для иммунологической диагностики бесплодия основными являются параиммунологические пробы, в частности, тест на проникновение спермиев в цервикальную слизь. Проведенные исследования показали, что процесс замораживания-отогрева достоверно не влияет на тест Курцрока-Миллера (рис. 3, 4).

Данные об устойчивости к холодовому воздействию поверхностных антигенных детерминант спермиев человека подтверждаются результатами MAR-теста. Исследования показали, что при

loss of this organella by cells during freeze-thawing, that together with low percent of the change in this group of pathology may testify to an effective cryoprotection. It also worth of emphasising that a rise in percentage of mixed pathology should not optionally occur due to the group of normal cells, since a disorder of all morphological spermatozoa parts is hardly to be supposed during cryopreservation. Therefore we believe this group after thawing is also increased because of the cryodamage of spermatozoa from other pathological groups.

Studying human sperm before and after cryopreservation on strict morphological criteria enables to find actual consequences of cell suspension cryodamage and feasibility of further usage of warmed material in auxiliary reproductive technologies.

Sperm has a complex antigen content. Sperm antigens (over 30) are alien for own organism. Surface antigens are represented, in particular, by blood group antigens, ABO, Rh-Hr, MNS, P, HLA histocompatibility antigens, including D and Dr loci.

For immunological diagnosis of infertility para-immunological samples in particular test for sperm penetration into cervical mucus, are basic ones. Our findings showed that freeze-thawing did not significantly and statistically affect the results of Kurzrock-Miller test (Fig. 3, 4).

The data on cold resistance of surface antigen determinants of human sperm are confirmed by MAR-test results. Our findings demonstrated that at positive MAR-test after cell suspension thawing the binding of spermatozoa with latex particles took place. There was found positive correlation between the results of Kurzrock-Miller and MAR-tests.

Conclusions

Assessment of human spermatozoa on strict morphological criteria enables revealing true causes

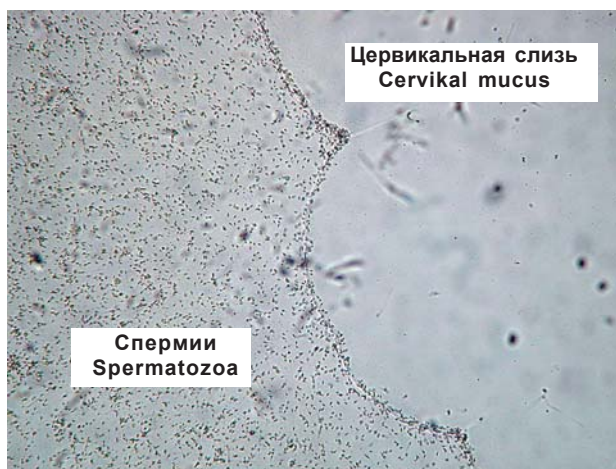


Рис. 3. Отрицательный тест-контакт спермиев с цервикальной слизью.

Fig. 3. Negative test-contact of sperm with cervical mucus.

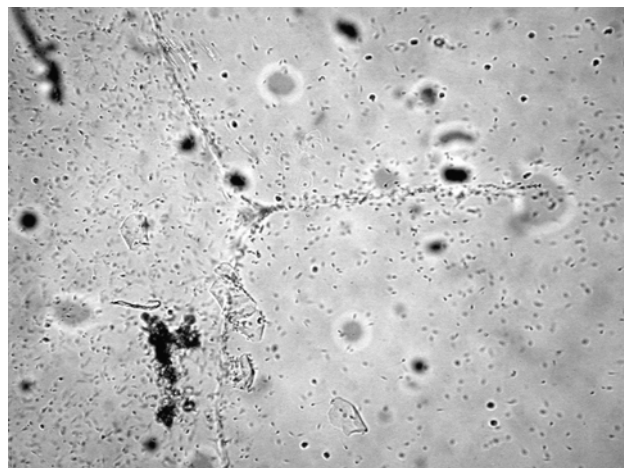


Рис. 4. Положительный тест-контакт спермиев с цервикальной слизью.

Fig. 4. Positive test-contact of sperm with cervical mucus.

положительном MAR-тесте после отогрева клеточной суспензии имело место связывание спермиев с частицами латекса. Отмечена положительная корреляция результатов теста Курцрока-Миллера и MAR- теста.

Выводы

Оценка спермиев человека по строгим морфологическим критериям позволяет выявить истинные причины нарушения функциональной активности клеток после холодового воздействия.

В результате криоконсервирования спермиев в условиях сверхбыстрого охлаждения наблюдается высокая криозащита гамет.

Процесс замораживания-отогрева не влияет на результаты основных тестов для иммунологической диагностики бесплодия.

Литература

1. Белоус А.М., Грищенко В.И., Паращук Ю.С. Криоконсервация репродуктивных клеток.– Киев: Наук. думка, 1986.– 206 с.
2. Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Лучко Н.А. и др. Криоконсервация спермы в условиях сверхбыстрого охлаждения // Криоконсервирование репродуктивных клеток и эмбрионов.– Харьков, 1992.– С. 44-47.
3. Кучков И.Н. Функциональные и биохимические свойства спермиев человека при криоконсервации в условиях сверхбыстрого охлаждения: Автореф. дис...канд. биол. наук.– Харьков, 2000. – 17 с.
4. Fawcett D.W. The mammalian spermatozoon // Dev. Biol.– 1975.– Vol. 44, N2.– P. 394-436.

Поступила 06.12.2005

of disorder in functional activity of cells after cold effect.

High cryoprotection of gametes is observed as a result of sperm cryopreservation under ultrarapid cooling.

Freeze-thawing does not affect the results of main tests for immunological diagnosis of infertility.

References

1. Belous A.M., Grischenko V.I., Paraschuk Yu.S. Cryopreservation of reproductive cells.– Kiev: Naukova Dumka, 1986.– 206 p.
2. Grischenko V.I., Kalugin Yu.V., Luchko N.A. et al. Sperm cryopreservation under ultrarapid cooling // Cryopreservation of reproductive cells and embryos.– Kharkov.– 1992.– P. 44-47.
3. Kuchkov I.N. Functional and biochemical properties of human spermatozoa during cryopreservation under ultrarapid cooling conditions: Author's abstract of thesis of candidate of biological sciences.– Kharkov, 2000.– 17 p.
4. Fawcett D.W. The mammalian spermatozoon // Dev. Biol.– 1975.– Vol. 44, N2.– P. 394-436.

Accepted in 06.12.2005