

¹Б.А. Усіпбек, ²Р.Т. Джумашева, ²М.Ж. Жумагул, ¹Н.Т. Аблайханова, ¹З.Б.Есимситова, ³В. Исаченко

¹Казахского национального университета имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

²Казахский Медицинский Университет имени С.Д. Асфендиярова, кафедра молекулярной биологии и медицинской генетики

³Отделении акушерства и гинекологии, Университетская материнская больница, Кельнский университет, Кельн, Германия

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЗАМОРАЖИВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ ЖИВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

В настоящее время замораживание в жидком азоте спермы человека является надежным и широко распространенным способом хранения в течение многих лет. Изучение методов криоконсервации и их ущерба, вызванного, замораживанием низкой температурой и содержанием воды имеет важное экспериментальное значение в применении. Однако, на сегодняшний день, в большинстве стран мира хранение спермы при температуре жидкого азота имеет некоторые недостатки, проявляющие в необходимости постоянного снабжения станций и пунктов искусственного осеменения жидким азотом, высокую стоимость криогенного оборудования, гибель в процессе криоконсервации до спермиев. Все это вынуждает к поиску новых способов длительного хранения спермы. Из литературных данных известно, что воздействие низких температур до -196 градусов способны пережить не все сперматозоиды, число подвижных спермиев снижается на 20-25%. Но для спермы, основные показатели, которой перед «заморозкой» были в норме. Следовательно, такие потери не влияют на успешность процедуры ЭКО. В связи с этим необходимо более детально исследовать процессы криоконсервации, чтобы выявить причины и закономерности гибели спермиев на разных его этапах оплодотворения и изучить некоторые подходы к ее решению.

Ключевые слова: криоконсервация, сперма, искусственное осеменение, сперматозоид, температура, жидкий азот, замораживание.

Криоконсервация – замораживание и хранение живых биологических объектов с возможностью восстановления их биологических функций после размораживания. За последнее десятилетие в развитии репродуктивной медицины во всем мире отмечается тенденция к криоконсервации сперматозоидов. Метод криоконсервации позволяет сохранять качество биологического материала на протяжении нескольких лет, что достигается благодаря тщательной разработке и изучению методик замораживания и оттаивания. Такой подход обеспечивает большую управляемость и эффективность лечения в преодолении мужского и женского бесплодия. Для криоконсервации используют очень низкие температуры. Стандартом является -196°C . Сосуды с генетическим материалом помещают в жидкий азот, который и обеспечивает данную температуру. Использовать более высокие температуры для хранения данного биологического материала нецелесообразно, поскольку они малоэффективны и не позволяют сохранить репродуктивную функцию.

Одна из главных проблем криоконсервации - минимизировать длительность воздействия на эмбрионы и ооциты принципиально вредных воздействий, а также избежать повреждения клеток образующимися во время замораживания кристаллами льда. На сегодняшний день существует два способа криоконсервации эмбрионов: медленное замораживание и витрификация. Медленное замораживание до недавнего времени было единственным эффективным способом сохранения эмбрионов. Однако при использовании этой методики образуются кристаллы льда, которые травмируют клетки. Относительно недавно получила широкое распространение альтернативная методика – витрификация. Витрификация облегчает и упрощает процесс замораживания эмбрионов. Преимущество этого метода в том, что эмбрионы не повреждаются кристаллами льда, как это происходит при контролируемой медленной криоконсервации, - жидкость, содержащаяся в клетках эмбрионов под воздействием специальных веществ переводится в стекловидное состояние.

Исследователями обнаружено, что при сверхбыстром охлаждении малых объемов спермы (прямое погружение в жидкий азот) спермии погибают. Исключения представляли только некоторые образцы спермы жеребцов, а также человека. Замораживая сперму кролика в тонкостенных (10 мкм) алюминиевых пакетиках, наблюдалось возобновление движения спермиев лишь при быстром оттаивании в теплой (38°C) воде. При медленном оттаивании на воздухе все спермии неизменно погибали. Эту гибель в данном случае легче всего объяснить с позиции гипотезы витрификации. И.В. Смирнов и А. Е. Бруенко установили, что при повышении скорости оттаивания гранул замороженной спермы (объем гранулы 0,1 мл) резко увеличивается процент спермиев, возобновляющих движение. Таких спермиев при температуре оттаивания 0°C было 19%, при 20°C – 30 %, при 40°C –43,5 %, при 50°C –50,55 %, при 60°C –58%, при 70°C –65 %. Чтобы устранить возможную гибель спермиев от перегрева, флаконы со спермой, не дожидаясь полного оттаивания гранул, переносили из «горячих» ванн в воду с температурой $+30^{\circ}\text{C}$. Очевидно, при быстром нагреве удастся избежать рекристаллизации витрифицированной спермы в температурной зоне, где скорость кристаллизационных процессов наиболее высока. Заметим, кстати, что эти данные свидетельствуют о том, что часть клеток погибает не в процессе замораживания, а при оттаивании.

В экспериментах показано, что у сперматозоидов петуха, частично обезвоженных путем добавления к сперме левулозы, после быстрого замораживания при -76° и оттаивания при температуре $42\text{—}45^{\circ}$ восстанавливалась подвижность. Когда пробы в течение многих дней или нескольких месяцев хранили при температуре -76° , оживало около 30% сперматозоидов. Из 48 яиц, снесенных курами, которые были осеменены замороженной спермой, 12, казалось, были оплодотворены, но развитие эмбриона в них, наблюдавшееся невооруженным глазом, продолжалось не более 10–15 час. Когда в дальнейшем некоторые исследователи пытались применить методику витрификации человеческой спермы по Льюету, лишь у незначительного числа сперматозоидов, охлажденных до очень низких температур, после согревания восстанавливалась подвижность. Не лучшие результаты были получены в аналогичных опытах со сперматозоидами других млекопитающих.

В научно-исследовательских работах Паркс частично разъяснил причину различий в результатах предшествующих исследователей. Он показал, что высокий процент человеческих сперматозоидов выживает после охлаждения до -79 или -196° и живет в течение длительного времени лишь в том случае, когда сравнительно большие пробы спермы охлаждают в ампулах или в широких пробирках. Очень быстрое охлаждение микроскопически малых проб в тонких капиллярах или в виде пленки не дает эффекта. Это послужило первым несомненным доказательством того, что быстрое охлаждение и согревание может принести вред сперматозоидам или другим клеткам млекопитающих. Сперматозоиды других млекопитающих не переносили быстрого охлаждения до очень низких температур даже в тех случаях, когда замораживали большие пробы спермы. Однако в то время не видели никакой опасности в самом сверхбыстром охлаждении. Наоборот, глубоко укоренилось мнение, что основной причиной повреждения живых клеток в процессе замораживания и оттаивания является образование кристаллов льда [1].

В настоящее время разработаны различные протоколы криоконсервации эмбрионов человека на различных стадиях развития: на стадии зиготы — формирования пронуклеусов, в период дробления и на стадии бластоцисты [2-4]. В данный момент разработаны и успешно применяются в медицине, сельском хозяйстве и научном эксперименте методы криоконсервации клеточных культур, тканей (кровь, сперма), ранних (преимплантационных) эмбрионов. Изолированные органы плохо переносят криоконсервацию, методы криоконсервации целых органов не разработаны, эффективность их низкая. Случаи успешной трансплантации криоконсервированных органов редки, как правило, в таких случаях речь может идти не о восстановлении после размораживания целого органа, а о присутствии в размороженном органе отдельных областей живой ткани. Другими словами, выживает после криоконсервации не орган как единое целое, а участки ткани, которые могут после трансплантации успешно

прижиться (например, при трансплантации размороженной яичниковой ткани). Случаи успешной криоконсервации теплокровных животных (в том числе человека) до сих пор не зафиксированы. В настоящее время не существует методов, обеспечивающих выживание криоконсервированных людей, иных млекопитающих животных, а также птиц [5-7].

Криоконсервация спермы может применяться с целью сохранения биологического материала без наличия медицинских показаний, т.е. по желанию пациента. Развитие репродуктивной медицины в начале 90-х годов позволило проводить оплодотворение сперматозоидами пациентов с олигозооспермией, а также сперматозоидами, полученными хирургическим путем у пациентов с азооспермией. При этом количество пригодных для оплодотворения подвижных нормальных сперматозоидов может оказаться крайне малым, а их выделение весьма трудоемким, что требует больших усилий и затрат времени. Если существует высокий риск повторного неполучения этого уникального генетического материала вследствие нарастающих необратимых изменений в репродуктивной сфере мужчины или даже такой прогноз просматривается - требуется сохранение выделенных единичных сперматозоидов путем криоконсервации [8].

Замораживание спермы без потери качества клеток стало возможным после открытия криопротекторных свойств глицерина при заморозке клеток в 1949г. Большинство криопротекторов, используемых сейчас, созданы на основе глицерина. Их главный недостаток – токсичность, потенциал которой во многом зависит от дозы, экспозиции и типа воздействия.

Применение глицерина происходящие при замерзании спермы, в частности способствует ее переохлаждению. В связи с этим появилось сомнения в возможности витрифицировать протоплазму, а также в полезности быстрого охлаждения и оттаивания спермы. Многие ученые считают, что при глубоком охлаждении спермы происходит не витрификация, а мелкокристаллическое затвердевание протоплазмы. Указывалось также, что витрификация чистой воды возможна лишь при огромных скоростях охлаждения – порядка 5000° С/С, такие скорости при глубоком охлаждении биологических объектов практически недостижимы.

Как правило, криоконсервацию осуществляют при температуре -196 °С, помещая капсулы с биологическими объектами в жидкий азот. Реже пользуются более высокими температурами (от -180 °С до -130 °С), которые создают электрифицированные морозильные камеры, но данный температурный режим менее надежен и подходит не для всех объектов. Использование температур выше -130 °С малоэффективно и используется редко (например, хранение на сухом льду при -79 °С). Сохранение живых объектов при температурах около нуля градусов традиционно не относят к криоконсервации. Использование низких температур обеспечивает остановку биохимических процессов в клетках, в том числе останавливается обмен веществ и энергией с внешней средой, благодаря этому живые объекты могут сохраняться сколь угодно долго [9].

Криоконсервация спермы при проведении вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) применяется в следующих случаях:

- для создания банка донорской спермы - в ситуациях, когда мужчина не может присутствовать в день проведения пункции фолликулов жены и сдать в этот же день сперму.

- перед началом лечения с применением лекарственных средств и технологий, которые могут повлечь за собой ухудшение или полное отсутствие оплодотворяющей способности спермы (онкологические заболевания, гепатит С, оперативные вмешательства, такие как орхэктомия, вазэктомия, и др.).

- до начала служебных командировок в процессе которых не исключено воздействие неблагоприятных факторов внешней среды на организм в целом или органы (в первую очередь гонады), участвующие в сперматогенезе (космонавты, ликвидаторы аварий на атомных станциях, военные и др.).

- при необходимости концентрации и накопления сперматозоидов при их недостаточном количестве в эякуляте [10]

Криоконсервация спермы не оказывает влияния на генетическую информацию и качественные характеристики спермиев, успешно перенесших заморозку и разморозку. Но часть половых клеток при размораживании погибает. Выживает по разным данным от 60 до 75%, что достаточно для проведения экстракорпорального оплодотворения и искусственной инсеминации. Отсутствуют данные о снижении частоты оплодотворения и успешного развития беременности при использовании в программах ЭКО сперматозоидов, удачно перенесших разморозку. Свойства замороженной спермы сохраняются в течение 3 лет при правильном хранении. После этого срока она начинает терять свои качества. Но известны случаи успешного применения замороженной спермы в программах ЭКО по истечении 13 и 21 года после криоконсервации. Технологии заморозки спермы позволяют сохранить функции и морфологическую структуру мужских гамет. Есть данные о получении жизнеспособных гамет после разморозки спермы, замороженной 28 лет тому назад.

Как правило, «сильные» и генетически полноценные сперматозоиды разморозку переносят хорошо. Разные лаборатории репродуктивных центров проводят разморозку спермы, используя разные техники оттаивания:

- при комнатной температуре;
- в морозильной камере с обратной программой заморозки;
- на водяной бане, нагретой до 37 °С.

Все перечисленные методы разморозки направлены на то, чтобы скорость оттаивания соответствовала скорости замораживания. Криосоломину извлекают из сосуда Дьюара, размораживают в штативе одним из перечисленных способов. После чего сразу производят отмывку специальными растворами для предупреждения токсического влияния глицерина и оценивают качество размороженных сперматозоидов [11-13].

Основные факторы, кроме резкого снижения обмена веществ, для препятствия сохранности биологических объектов при замораживании:

1. Образование кристаллов льда внутри клеток - самый важный повреждающий фактор при криоконсервации. Вода обладает свойством расширяться при замерзании: при образовании кристаллов льда их объем будет больше, чем у исходной жидкости. В связи с этим образовавшийся лед необратимо повредит клеточные структуры, и клетка погибнет. Даже небольшие кристаллики льда необратимо повреждают внутриклеточные структуры (ядро, митохондрии, аппарат Гольджи, эндоплазматическую сеть), без целостности которых, даже при сохранении цитоплазматической мембраны самой клетки, ее жизнедеятельность невозможна. Наибольшая вероятность формирования кристаллов внутри клеток возникает при их неконтролируемом замораживании.

2. Образование кристаллов льда вне клеток, также приводит к гибели клеток за счет обезвоживания. В процессе заморозки образуются кристаллы льда, и за счет этого уменьшается количество свободной воды, способной взаимодействовать с электролитами раствора. Это приводит к увеличению концентрации растворенных веществ во внеклеточном пространстве (раствор становится гипертоническим по отношению к внутриклеточной среде), а также изменению pH. Соответственно, нарастает осмотическое давление, и начинает увеличиваться поток воды, выходящей из клетки, что приводит к уменьшению количества воды внутри клетки и, как следствие, к нарушению структуры белков. Чем ниже температура, тем больше воды вне клетки превратится в лед, а значит меньше свободной воды остается вне клеток, и чем сильнее клетки обезвоживаются, тем больше повреждаются их структуры, и тем меньше шансов остается на восстановление их функциональности после размораживания. Образование внеклеточного льда наиболее интенсивно при очень медленной скорости заморозки [14].

3. Перегрев клеток в момент фазового перехода вода/лед — как ни парадоксально, в процессе заморозки клетки могут погибнуть от перегрева. При фазовом переходе внеклеточной воды из жидкого состояния в лед, обладающий значительно меньшей энтропией (твердое вещество) по сравнению с жидкостью, выделяется избыточное тепло, что может привести к необратимому повреждению клеток. Для предотвращения гибели клеток от перегрева их очень быстро охлаждают около точки фазового

перехода — при температуре охлажденной жидкости, равной температуре начала кристаллизации раствора (сидинг), запуская формирование кристаллов льда.

4. Фазовые переходы в липидном бислое мембран. В процессе медленного охлаждения при температуре около 0 °С наблюдаются сильные изменения структуры плазматической мембраны — резко уменьшается ее текучесть и повышается вязкость и, как следствие, изменяется проницаемость мембраны для ионов, что приводит к сдвигу pH. Прекращается работа Na⁺-каналов, а это приводит к накоплению ионов Na⁺ внутри клетки, а вместе с ними и воды. В результате клетка сильно разбухает, что может привести к ее лизису.

5. Холодовой шок — до конца необъясненное явление внезапной гибели клеток при низких температурах [15]

Для предотвращения образования кристаллов льда, губительно воздействующих на клетки, применяют разнообразие веществ с относительно низкими температурами замерзания — криопротекторы. Криопротекторы — вещества, защищающие живые объекты от повреждающего действия замораживания. Криопротекторы используют при криоконсервации — низкотемпературном хранении живых объектов (другими словами, при замораживании клеточных культур, крови, спермы, эмбрионов, изолированных органов и биологических объектов целиком). При замораживании на живые объекты воздействуют два повреждающих фактора: формирование внутриклеточного льда и обезвоживание. Помещение живых объектов в растворы криопротекторов и замораживание в этих растворах снижает или исключает полностью формирование внутриклеточного льда и обезвоживание.

Существует большое количество веществ, обладающих криопротекторными свойствами, но в медицинской и лабораторной практике используют не более десятка соединений, которые будут перечислены ниже. Различают криопротекторы двух типов: проникающие и непроникающие. К проникающим относят криопротекторы, проникающие внутрь клетки. Проникающие криопротекторы препятствуют формированию кристаллов льда за счёт образования водородных связей с молекулами воды. Наиболее распространенные проникающие криопротекторы: глицерин, пропиленгликоль, этиленгликоль, диметилсульфоксид.

1. Проникающие криопротекторы способны попасть внутрь клетки и препятствовать формированию кристаллов льда за счет формирования водородных связей с молекулами воды. Они сами замещают воду, что препятствует криодеструкции биологически важных макромолекул, и связывают некоторое количество свободной воды (что уменьшает общую дегидратацию клеток). Кроме того, проникающие криопротекторы образуют водородные связи с макромолекулами клетки, что стабилизирует их структуру [15].

2. К непроникающим относят криопротекторы, не проникающие внутрь клеток. Принцип действия непроникающих криопротекторов до конца не ясен. Вероятно, оно двояко: снижение скорости роста кристаллов и защита клетки от осмотических перепадов. К непроникающим криопротекторам относят две группы веществ: олигосахариды (наиболее часто используют сахарозу и трегалозу) и высокомолекулярные соединения (наиболее часто используют фиколл, альбумин, поливинилпирролидон). Использование непроникающих криопротекторов в отсутствие проникающих неэффективно, то есть непроникающие криопротекторы являются дополнительными компонентами в растворах проникающих криопротекторов.

После размораживания живые объекты необходимо освободить от криопротекторов. Защитный механизм криопротектора на клетку основан на таких эффектах:

- возможности проникать в клетку;
- способности к дегидратации (вытеснению молекул воды, что приводит к уменьшению образований кристаллов, повреждающих органеллы и клеточную стенку);
- способности уменьшать концентрации электролитов позволяет снижать осмотическое давление в клетке;
- взаимодействие с фосфолипидами клеточной стенки приводит к снижению точки замерзания, а это защищает мембрану клетки.

Криоконсервация спермы — метод достойный уважения, позволяющий обходить многие подводные камни бесплодия. Научные работы по усовершенствованию метода продолжаются. Кроме того, ведутся работы по определению и разработке альтернативных методов длительного хранения сперматозоидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Белоус А. М., Грищенко В. И. Криобиология. — Киев: Наукова думка, 1994. - 432 с.
- 2 Загребельная И.В. Современные аспекты патогенеза и лечения эндокринного бесплодия // Международный медицинский журнал. - 2010. - №1. - С. 178-196.
- 3 Инюшин В. М., Чекуров П. Р., Биостимуляция лучом лазера и биоплазма. — Алма-Ата: Казахстан, 2007. — 404 с.
- 4 Gardner D.K., Weissman A., Howles C.M., Shoham Z. «Textbook of Assisted Reproductive Technologies Laboratory and Clinical Perspectives». — London: Informa UK, 2009. — 944 p.
- 5 Horsman K.M., Barker S.L., Ferrance J.P., Forrester K.A., Koen K.A., Landers J.P. «Separation of sperm and epithelial cells in a microfabricated device: potential application to forensic analysis of sexual assault evidence.» // Anal. Chem. — 2005. - №77. — P. 742–749.
- 6 Isachenko V., Alabart J.L., Dattena M., Cappai P., Nawroth F., Isachenko E., Cocero M.J., Olivera J., Roche A., Accardo C., Folch J. «New technology for vitrification and field (microscope-free) thawing and transfer of the small ruminant embryos.» // Theriogenology. — 2003. - №59. — P. 1209–1218.
- 7 Isachenko V., Montag M., Isachenko E., Nawroth F., Dessole S., Van der Ven H. «Developmental rate and ultrastructure of vitrified human pronuclear oocytes after step-wise versus direct rehydration.» // Hum. Reprod. — 2004. - №19. — P. 660–665.
- 8 Kuleshova L.L., Shaw J.M., Trounson A.O. «Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation.» // Cryobiology. — 2001. - №43. — P. 21–31.
- 9 Kuleshova L.L., MacFarlane D.R., Trounson A.O., Shaw J.M. «Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes.» // Cryobiology. — 1999. - №38. — P. 119–130.
- 10 Lucena E., Bernal D.P., Lucena C. et al. «Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes.» // Fertil. Steril. — 2006. - №85. — P. 108–111.
- 11 Patist A., Zoer H. «Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems.» // Colloids Surf. B Biointerfaces. — 2005. - №40. — P. 107–113.
- 12 Rall W.F., Fahy G.M. «Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification.» // Nature. — 1985. - №313. — P. 573–575.
- 13 Tucker M.J., Liebermann J. «Vitrification in ART.» — London: Informa UK, - 2007. — 322 p.
- 14 Villarreal M.A., Diaz S.B., Disalvo E.A., Montich G.G. «Molecular dynamics simulation study of the interaction of trehalose with lipid membranes.» // Langmuir. — 2004. - №20. — P. 7844–7851.
- 15 Voorhees, J.C., Ferrance, J.P., Landers, J.P. «Enhanced elution of sperm from cotton swabs via enzymatic digestion for rape kit analysis.» // J. Forensic Sci. — 2006. - №51. — P. 574–579.

¹Б.А. Үсіпбек, ²Р.Т. Джумашева, ²М.Ж. Жумагул, ¹Н.Т. Аблайханова, ¹З.Б.Есимситова, ³В. Исаченко
¹Ал-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университеті, Қазақстан, Алматы
²С.Д.Асфендияров атындағы Қазақ Ұлттық Медициналық Университеті, Алматы
*³Акушерлік гинекологиялық бөлімі, Университеттік аналық аурухана,
Кельнс университеті, Кельн, Германия*

ТІРІ БИОЛОГИЯЛЫҚ ОБЪЕКТІЛЕРДІ МҰЗДАТУ ЖӘНЕ САҚТАУДЫҢ ТЕХНОЛОГИЯЛЫҚ АСПЕКТІЛЕРІ

Түйін: Қазіргі уақытта сұйық азоттағы адамның ұрығын мұздату көптеген жылдар бойы сенімді әрі кеңінен таралған сақтау әдісі болып табылады. Криоконсервация әдістерін және оларды төмен температураның және судың мазмұнының қатуынан туындаған зақымдануды қолдану тәжірибеде маңызды эксперименталды маңызға ие. Дегенмен, бүгінгі таңда, әлемнің көптеген елдерінде сұйық азот температурасында сперматозоидтарды сақтау кейбір кемшіліктерге ие, бұл станцияларды және сұйық азотпен жасанды ұрықтандыру станцияларын үздіксіз жеткізу қажеттілігін, криогенді жабдықтардың жоғары құны, криоконсервация процесінде өлімнің сперматозоидтарға дейін қажеттілігін көрсетеді. Мұның бәрі сперматозоидтарды ұзақ уақыт бойы сақтаудың жаңа жолдарын іздестіруге әкеледі. Әдеби мәліметтер бойынша төмен температуралардың -196 градусқа дейін әсерін барлық сперматозоидтардан аман сақтай алмайтыны белгілі, мобильді сперматозоидтар саны 20-25% -ға азаяды. Бірақ сперматозоидтар үшін «мұздатуға» дейінгі негізгі көрсеткіштер қалыпты болды. Демек, мұндай шығындар ҚҰО рәсімінің табысына әсер етпейді. Осыған байланысты ұрықтандырудың әртүрлі кезеңдерінде ұрықтың өлімінің себептері мен үлгілерін анықтау және оны шешудің кейбір тәсілдерін зерделеу үшін криоконсервация процестерін егжей-тегжейлі зерделеу қажет.

Түйінді сөздер: криоконсервация, сперма, жасанды ұрықтандыру, сперматозоид, температура, сұйық азот, мұздату.

¹B.A. Ussipbek, ²R.T. Jumashева, ²M. Zhumagul, ¹N.T. Ablayhanova, ¹Z.B. Esimsitova, ³V. Isachenko
¹Al-Farabi Kazakh National University, Almaty city, Kazakhstan
*²Asfendiyarov Kazakh National Medical University
Department of molecular biology and medical genetics*
³University Maternal Hospital, Cologne University, Germany

TECHNOLOGICAL ASPECTS OF FREEZING AND STORAGE OF LIVING BIOLOGICAL OBJECTS

Resume: Currently, freezing in liquid nitrogen is a reliable and widespread method for storage of human sperm for many years. Studying cryopreservation methods and the damage, caused by the freezing in low temperature and in the presence of water, has an important experimental significance in the application. However, to date, in most countries of the world, the storage of sperm at liquid nitrogen temperature has some drawbacks, showing the need for continuous supply of stations and artificial insemination stations with liquid nitrogen, the high cost of cryogenic equipment, death in the process of cryopreservation to spermatozoa. All this leads to the search for new ways of long-term storage of sperm. It is known from the literature data that not all sperms are able to survive at a low temperature up to -196 degrees, the number of mobile spermatozoa decreases by 20-25%. But for sperm the main indicators are those which were normal before the "freezing". Consequently, such losses do not affect the success of the IVF procedure. In this regard, it is necessary to study in more details the processes of cryopreservation in order to find out the causes and patterns of sperm death at its various stages of fertilization and to study some approaches for its solution.

Keywords: cryopreservation, sperm, artificial insemination, temperature, liquid nitrogen, freezing.