

## Диэлектрическая проницаемость эякулятов человека при нормо- и патоспермии после взаимодействия с криозащитной средой

В.Л. Родионова<sup>1</sup>, Н.Н. Чуб<sup>1</sup>, Т.Ю. Шеголева<sup>2</sup>, П. Тодоров<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>Институт радиофизики и радиоэлектроники НАН Украины, г. Харьков

<sup>3</sup>Институт биологии и иммунологии размножения БАН, г. София, Болгария

## Dielectric Permittivity of Human Ejaculate at Normo- and Pathospermia after Interaction with Cryoprotective Medium

V.L. RODIONOVA<sup>1</sup>, N.N. TCHOOB<sup>1</sup>, T.YU. SCHEGOLEVA<sup>2</sup>, P. TODOROV<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

<sup>2</sup>Institute of Radiophysics and Radioelectronics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

<sup>3</sup>Institute of Biology and immunology of Reproduction of the Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

Методом КВЧ диэлектromетрии показано, что действительная  $\epsilon'$  и мнимая  $\epsilon''$  части диэлектрической проницаемости изменяются в зависимости от патологии сперматогенеза. Глицерин-лактоза-желточная криозащитная среда влияет на состояние водного компонента эякулята, уменьшает содержание свободной воды в спермиях.

**Ключевые слова:** диэлектрическая проницаемость, астеноспермия, олигоспермия, криозащитная среда.

Методом КХЧ діелектromетрії показано, що дійсна  $\epsilon'$  і уявна  $\epsilon''$  частини діелектричної проникності змінюються в залежності від патології сперматогенезу. Гліцерин-лактоза-жовточне середовище впливає на стан водного компонента еякулята, зменшує вміст вільної води в сперміях.

**Ключові слова:** діелектрична проникність, астеноспермія, олігоспермія, криозахисне середовище.

Using the SWF-dielectrometry the real ( $\epsilon'$ ) and imaginary ( $\epsilon''$ ) parts of dielectric permittivity were shown to be changed depending on spermatogenesis pathology. A glycerol-lactose-yolk cryoprotective medium affects the state of the ejaculate water component, decreases the free water content in spermatozoa.

**Key-words:** dielectric permeability, asthenospermia, oligospermia, cryoprotective medium

Функциональная полноценность спермиев определяется их структурой, кинетическими и молекулярными преобразованиями, которые влияют на метаболизм и фертильность гамет [7]. Из-за ограниченной переживаемости спермиев *in vitro* исследования эякулятов представляют определенные трудности. В настоящей работе для оценки функционального состояния спермиев был применен метод КВЧ диэлектromетрии на частоте 40 ГГц, который позволяет проводить экспресс-тестирование в суспензии подвижных клеток, изучить состояние водной компоненты клетки в условиях, исключающих ее разрушение или модификацию. Физической основой для интерпретации данных, получаемых этим методом, является различие областей дисперсии воды и биообъектов. Вода, содержащаяся как в биообъектах, так и в их окружении играет важную роль на всех этапах криоконсервирования [5]. Одна часть воды включена в структуру макромолекул, другая – является репликой данной структуры. Кроме того, вода, образует протяженные ассоциа-

Functional integrity in spermatozoa is determined by their structure, kinetic and molecular rearrangements, affecting metabolism and fertility of gametes [3]. It is difficult to study ejaculates because of the limited spermatozoa survival rate *in vitro*. The method of SWF-dielectrometry at the frequency of 40 GHz, permitting to perform the express-testing in the suspensions of motile cells and to study the state of aqueous cell component under conditions excluding its destruction or modification, was used in this work in order to estimate the functional state of spermatozoa. The physical base for interpreting the data, obtained by this method is the difference in the fields of water and bioobjects dispersion. Water, being both in bioobjects and in their environment, plays an important role at all cryopreservation stages [3]. One part of water is included into the macromolecule structure and the another one is the replica of this structure. In addition, there is the water, forming the extended aqueous associates between macromolecules, which are fixed by "water-water" hydrogen bonds [7]. Within the range of hundreds MHz there is the dispersion field

**Адрес для корреспонденции:** Чуб Н.Н., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-11-19, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

**Address for correspondence:** Tchoob N.N., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 772 1119, fax: +380 57 772 0084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

ты между макромолекулами, поддерживаемые водородными связями [7]. В диапазоне нескольких сотен МГц находится область дисперсии связанной воды, в СВЧ и КВЧ диапазонах (частота более 10 ГГц) – область дисперсии свободной воды. В этой области диэлектрическая проницаемость объектов определяется количеством диполей воды, участвующих в релаксационном процессе. Часть связанной с ними воды исключается из процесса релаксации. Принято считать, что изменение величины действительной части диэлектрической проницаемости характеризует ориентационные эффекты молекул воды в системе, в то время как мнимая часть диэлектрической постоянной характеризует количество свободной воды в эякуляте.

Макромолекулярные структуры спермиев имеют сложное гидратное окружение, которое может изменяться при действии различных физиологических и физико-химических факторов. Изменения диэлектрических параметров свидетельствуют о функциональных перестройках в клетке, что позволяет опосредованно судить об их жизнеспособности [2,6,7].

Цель работы – исследование диэлектрической проницаемости эякулятов человека при нормо- и патоспермии и после взаимодействия гамет с глицерин-лактоза-желточной средой.

### Материалы и методы

Материалом исследования служили 48 эякулятов, полученных у мужчин в возрасте 25-40 лет после 3-5-дневной половой абстиненции. После разжижения в 0,2 мл эякулята добавляли 10 мкл криозащитной среды – глицерин-лактоза-желток (ГЛЖ). Концентрацию и подвижность спермиев определяли в камере Macler (Израиль) на световом микроскопе PZO (Польша), ( $\times 480$ ) согласно рекомендациям ВОЗ [9].

С помощью КВЧ диэлектрометра А17 “НИЛУК” (длина волны 7,6 мм), разработанного Проблемной научно-исследовательской лабораторией молекулярных механизмов ИПЭ [6], измеряли параметры стоячей волны ( $L_1$  и  $L_2$ ) при внесении образца в волновод, определяли смещение минимума стоячей волны  $\Delta L$  и ширину ее удвоенного минимума  $X$ . По полученным данным  $\Delta L$  и  $\Delta X$  вычисляли комплексную диэлектрическую проницаемость  $\epsilon^*$  решением трансцендентного уравнения [7]:

$$C_{th}(i\gamma_3 d)/(i\gamma_3 d) = i(1/\gamma_4 d) [(1+R^*)/(1-R^*)],$$

где  $\gamma_3 = 2\pi/\lambda[\epsilon' + i\epsilon'' - (\lambda/\lambda_{кр})^2]^{1/2}$ ;  $R^*$  – коэффициент отражения, модуль которого равен выражению  $(K_{св}-1)/(K_{св}+1)$ , аргумент –  $4\pi/\lambda_w(d + \Delta L) + n\pi$ ;

of bound water, the area of free water dispersion is within the UHF and SWF ranges (frequency more than 10 GHz). In this area a dielectric permittivity of objects is determined by the amount of water dipoles, participating in a relaxation process. A part of water bound with them is excluded from relaxation process. The change in a value of the real part of dielectric permittivity is assumed to characterise the orientation effects of water molecules in the system, meanwhile an imaginary part of dielectric constant characterises the amount of free water in the ejaculate.

The macromolecular structures of spermatozoa have a complex hydrate environment that can be changed under the effect of different physiological, physical and chemical factors. The change in dielectric parameters testifies to the functional rearrangements in a cell, that allows to indirectly judge about their viability [2, 6, 7, 8].

The aim of this work is to investigate a dielectric permittivity of human ejaculates at normo- and pathospermia and after gamete interaction with glycerol-lactose-yolk medium.

### Materials and methods

As the investigation material we have taken 48 ejaculates, obtained from 25-40 aged men after 3-5 days of abstinence. After dilution 10  $\mu$ l of cryoprotective medium: glycerol-lactose-yolk (GLY) were added in 0.2 ml of ejaculate. The concentration and motility of spermatozoa were determined in the Makler chamber (Israel) with a light microscope PZO (Poland) ( $\times 480$ ) according to the WHO recommendations [9].

Using the SWF-dielectrometer A17 “NILUK” (7.6 mm wavelength), developed by the Problem Research Laboratory of Molecular Mechanisms of the Institute of Radio Physics and Radio Electronics [6], we measured the parameters of standing wave ( $L_1$  and  $L_2$ ) when introducing the sample into the wave guide, we determined the shifting of standing wave minimum  $\Delta L$  and the width of its double minimum  $\Delta X$ . According to the obtained data of  $\Delta L$  and  $\Delta X$  there was calculated a complex dielectric permittivity  $\epsilon^*$  by solving the transcendental equation [7].

$$C_{th}(i\gamma_3 d)/(i\gamma_3 d) = i(1/\gamma_4 d) [(1+R^*)/(1-R^*)],$$

where  $\gamma_3 = 2\pi/\lambda[\epsilon' + i\epsilon'' - (\lambda/\lambda_{кр})^2]^{1/2}$ ;  $R^*$  is the reflection coefficient, which module is equal to  $(C_{св}-1)/(C_{св}+1)$ , and its argument is  $4\pi/\lambda_w(d + \Delta L) + n\pi$ ;  $C_{св}$  is the coefficient of standing wave, equal to  $(1+1/\sin^2(\pi\Delta X/\lambda_w))^{1/2}$ ;  $\lambda_{кр}$  is a critical length in the wave guide;  $\lambda$  is the wavelength in a free space;  $\lambda_w$  is the wavelength in the dielectric-filled wave guide;  $\gamma_4$  is the propagation constant in the fixing laying;  $d$  is the sample thickness.

$K_{св}$  – коэффициент стоячей волны, равный  $(1+1/\sin^2(\pi\Delta X/\lambda_{св}))^{1/2}$ ;  $\lambda_{кр}$  – критическая длина в волноводе;  $\lambda$  – длина волны в свободном пространстве;  $\lambda_{св}$  – длина волны в волноводе, заполненном диэлектриком;  $\gamma_4$  – постоянная распространения в крепежной прокладке;  $d$  – толщина образца.

Длительность измерения одной аликвоты 2 мин. Объем ячейки КВЧ диэлектromетра 50 мкл. Погрешность измерений составляла  $\pm 0,005$  мм. При статистической обработке полученных результатов использовали критерий Стьюдента.

Оценка эякулятов при нормоспермии (контроль) показала следующие результаты ( $n=22$ ): концентрация спермиев  $(66,2\pm 5,6)\times 10^6/\text{мл}$ , количество прогрессивно подвижной и подвижной фракций гамет (группа “а”+”b”)  $70,8\pm 6,7\%$ . При астено-спермии ( $n=11$ ) данные показатели составляли:  $(64,6\pm 6,1)\times 10^6/\text{мл}$  и  $36,9\pm 4,0\%$ , при олигоспермии ( $n=16$ ) –  $(15,7\pm 2,1)\times 10^6/\text{мл}$  и  $50,2\pm 10,1\%$  соответственно.

### Результаты и обсуждение

В наших исследованиях была обнаружена зависимость действительной части диэлектрической проницаемости от концентрации и подвижности клеток в эякуляте. При астено- и олигоспермии действительная часть диэлектрической постоянной  $\epsilon'$  достоверно ниже полученной при нормоспермии (рисунок а). По-видимому, нарушения в сперматогенезе влияют на морфологическую [3] и молекулярную структуры спермиев, что может приводить к изменению ориентационных эффектов молекул воды в системе и требует дополнительных исследований.

The duration of measuring for one aliquot is 2 min. The volume of SWF-dielectrometer cell is 50  $\mu\text{l}$ . The measurement error made 0.005 mm. Statistical processing of the results obtained was done with Student's criterion.

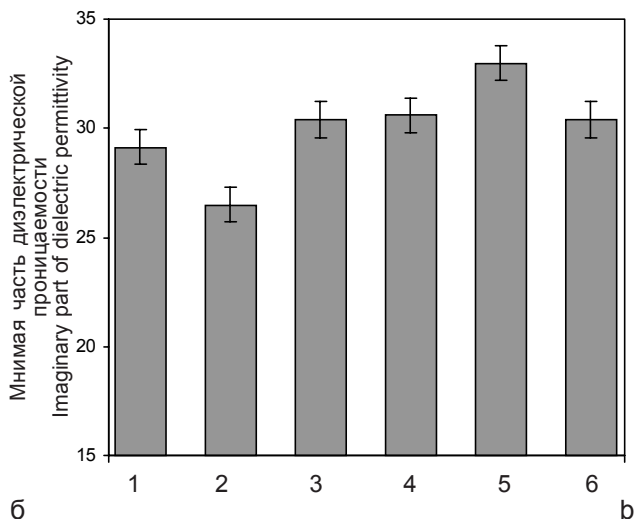
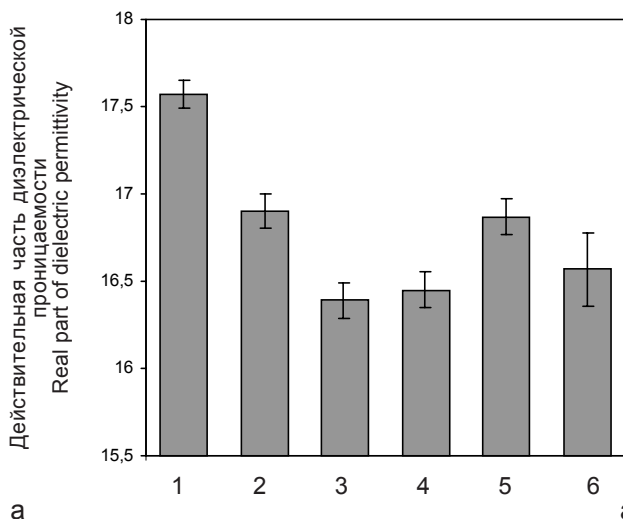
### Results and discussion

When estimating ejaculates at normospermia (the control) the following data were obtained ( $n=22$ ): spermatozoa concentration was  $(66.2\pm 5.6)\times 10^6/\text{ml}$ , the amount of forwardly motile and motile gamete fractions (group “a”+”b”) made  $70.8\pm 6.7\%$ . At the asthenospermia ( $n=11$ ) these indices made  $(64.6\pm 6.1)\times 10^6/\text{ml}$  and  $36.9\pm 4.0\%$ , as for oligospermia ( $n=16$ ) it made  $(15.7\pm 2.1)\times 10^6/\text{ml}$  and  $50.2\pm 10.1\%$ , correspondingly.

In our investigations there was revealed the dependency of a real part of dielectric permittivity on concentration and motility of cells in ejaculate. At asthenospermia and oligospermia a real part of dielectric constant  $\epsilon'$  is statistically and significantly lower than that at normospermia (Fig. a). Apparently, the disorders in spermatogenesis affect morphological [3] and molecular structure of spermatozoa, that may result in a change of orientation effect of water molecule in the system and should be additionally investigated.

When estimating the obtained values of an imaginary part of dielectric constant  $\epsilon''$  there was found out a statistically significant increase in this index at oligospermia (Fig. b), that was apparently related to a low concentration of spermatozoa in ejaculate and indicated to a change of a free water content in a suspension.

The experiments on studying the effect of GLY cryoprotective medium, that we used for human sperm cryopreservation [1] demonstrated, that the equi-



Показатели действительной (а) и мнимой (б) частей диэлектрической проницаемости образцов эякулятов человека при нормо- и патоспермии. 1 – нормоспермия; 2 – нормоспермия + ГЛЖ; 3 – астеноспермия; 4 – астеноспермия + ГЛЖ; 5 – олигоспермия; 6 – олигоспермия + ГЛЖ.

Indices of the real (a) and imaginary (b) parts of dielectric permittivity in the samples of human ejaculates at normo- and pathospermia. 1 – normospermia; 2 – normospermia + GLY; 3 – asthenospermia; 4 – asthenospermia + GLY; 5 – oligospermia; 6 – oligospermia + GLY.

При оценке полученных значений мнимой части диэлектрической постоянной  $\epsilon''$  было обнаружено достоверное увеличение данного показателя при олигоспермии (рисунок б), что, по-видимому, связано с низкой концентрацией спермиев в эякуляте и указывает на изменение содержания свободной воды в суспензии.

Эксперименты по изучению влияния криозащитной среды ГЛЖ, используемой нами для криоконсервирования спермы человека [1], показали, что эквипирация с ГЛЖ позитивно влияет на подвижность спермиев человека, увеличивая прогрессивно подвижную фракцию спермиев на 10-15%. Было отмечено, что количество свободной воды в суспензии при добавлении ГЛЖ также зависит от патологии сперматогенеза. Наблюдали достоверное снижение  $\epsilon''$  при нормо- и олигоспермии. Так как при астеноспермии в эякулятах имеется большое количество неподвижных с поврежденной цитоплазматической мембраной клеток, не способных связываться с криозащитной средой, диэлектрические показатели оставались без изменений (рисунок б). Это, по-видимому, сказывается на результатах криоконсервирования образцов данной патологии [4].

На рисунке а, видно достоверное снижение действительной части диэлектрической проницаемости  $\epsilon'$  (при  $P < 0,05$ ) при нормоспермии после добавления ГЛЖ по отношению к интактным образцам. При олигоспермии значения  $\epsilon'$  отличались значительно. В отличие от клеток крови, спермии в эякуляте находятся некоторое время в движении. При нормоспермии подвижность спермиев группы "а"+"б" после добавления ГЛЖ составляла около 80%. При олигоспермии концентрация спермиев в образцах низкая, однако подвижность спермиев у пациентов варьирует в широких пределах (от 1 до 52 %). Можно предположить, что снижение  $\epsilon'$  связано со стохастическим эффектом, обусловленным движением спермиев, что приводит к значительным колебаниям молекул воды вокруг клеток. Кроме того, нужно учитывать, что состав спермальной плазмы в норме и при патологии, а также у отдельных индивидуумов отличается [2]. Это может влиять на диэлектрические показатели спермы и является предметом наших дальнейших исследований.

## Выводы

Таким образом, методом КВЧ диэлектрометрии были получены различия в диэлектрических параметрах в зависимости от патологии сперматогенеза. По изменению параметров диэлектрической проницаемости можно судить как о состоянии водной компоненты в эякуляте, так и о гидратном окружении нативной и модифици-

рованной с ГЛЖ позитивно повлияло на подвижность человека сперматозоидов, увеличивая долю подвижных сперматозоидов на 10-15%. Однако количество свободной воды в суспензии зависит также от патологии сперматогенеза. Статистически значимое снижение  $\epsilon''$  при нормо- и олигоспермии наблюдается при добавлении ГЛЖ. Как при астеноспермии в эякулятах имеется большое количество неподвижных клеток с поврежденными цитоплазматическими мембранами, не способными связываться с криозащитной средой, диэлектрические показатели остались без изменений (рисунок б). Это, по-видимому, влияет на результаты криоконсервации образцов с этой патологией [4].

На рисунке а показан статистически значимый спад в действительной части диэлектрической проницаемости  $\epsilon'$  (при  $P < 0,05$ ) при нормоспермии после добавления ГЛЖ по отношению к интактным образцам. При олигоспермии значения  $\epsilon'$  значительно отличаются. В отличие от клеток крови, сперматозоиды в эякуляте некоторое время находятся в движении. При нормоспермии подвижность сперматозоидов группы "а"+"б" после добавления ГЛЖ составила около 80%. При олигоспермии концентрация сперматозоидов в образцах низкая, однако подвижность сперматозоидов у пациентов варьирует в широких пределах (от 1 до 52%). Можно предположить, что спад  $\epsilon'$  связан со стохастическим эффектом, полученным в результате движения сперматозоидов, что приводит к значительным колебаниям молекул воды вокруг клеток. Кроме того, нужно учитывать, что состав спермальной плазмы отличается в норме и при патологии, а также у отдельных индивидуумов [2]. Это может влиять на диэлектрические показатели спермы и является предметом наших дальнейших исследований.

## Conclusions

Thus, using the method of SWF-dielectrometry we obtained the differences in dielectric parameters depending on spermatogenesis pathology. By the change in parameters of dielectric permittivity one can judge on both state of water component in ejaculate and hydrate environment of native and modified cell. There were noted significant differences in the organisation of water component in cell suspensions of motile and immotile spermatozoa. GLY cryoprotective medium affects the state of water component of ejaculate, reduces the amount of free water in spermatozoa, that allows to improve the quality of cryopreservation.

*The authors acknowledge Kolesnikov V.G. and Dreval N.V. for their assistance when conducting the experiments.*

## References

1. Grischenko V.I., Chub N.N., Alipova E.K. et al. Cryopreservation of donor sperm // Problemy reproduktivnoy meditsiny. – 2001. – N2. – P. 71-73.

рованной клеток. Отмечены существенные отличия в организации водной компоненты в клеточных суспензиях подвижных и неподвижных спермиев. Криозащитная среда ГЛЖ влияет на состояние водного компонента эякулята, снижает количество свободной воды в спермиях, что позволяет улучшить качество криоконсервирования.

*Авторы благодарны В.Г. Колесникову и Н.В. Древалю за помощь в проведении экспериментов.*

### Литература

1. Грищенко В.И., Чуб Н.Н., Алипова Е.К. и др. Криоконсервирование спермы донора // Пробл. репродукции.– 2001.– №2.– С. 71-73.
2. Зубец М.В., Щеголева Т.Ю., Колесников В.Г. Индивидуальные, генетически детерминированные и породные особенности некоторых молекулярных механизмов управляющих комплексов клетки: эритроцитов и спермиев.– Киев: Вісник аграрної науки, 1997.– С. 38-42.
3. Молнар Е. Общая сперматология.– Будапешт, 1969.– 294 с.
4. Смаглий Н.Ю. Биохимические свойства спермы человека при криоконсервировании и некоторых видах патологии: Автореф. дис... канд. биол. наук.– Харьков, 1990.– 11 с.
5. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. Криопротекторы.– Киев: Наук. думка, 1978.– 230 с.
6. Щеголева Т.Ю. Исследование диэлектрических характеристик биообъектов в миллиметровом диапазоне радиоволн.– Киев: Наук. думка, 1996.– 187 с.
7. Щеголева Т.Ю. Измерение электрических параметров тонких образцов полидисперсных, жидких и твердых диэлектриков с большим поглощением в микроволновом диапазоне // Радиотехника и электроника.– 1981.– Т. 24, №11.– С. 2328–2333.
8. Щеголева Т.Ю., Колесников В.Г., Васильева Е.В. и др. Применение миллиметрового диапазона радиоволн в медицине.– Харьков, 1999.– 233 с.
9. *World Health Organization*. Laboratory manual for examination of human semen and semen- cervical mucus interaction.– Cambridge: University Press.– 1997.– 22 p.
2. *Zubets M.V., Schegoleva T.Yu., Kolesnikov V.G.* Individual, genetically determined and breed peculiarities of some molecular mechanisms of controlling complexes of cell: erythrocytes and spermatozoa.– Kiev: Visnyk agrarnoi nauky, 1997.– P. 38-42.
3. *Molnar E.* General spermatology.– Budapest.– 1969.– 294 p.
4. *Smaglyi N.Yu.* Biochemical properties of human sperm under cryopreservation and some kinds of pathology: Author's abstract of candidate of biological sciences.– Kharkov, 1990.– 11 p.
5. *Pushkar N.S., Shrago M.I., Belous A.M., Kalugin Yu.V.* Cryoprotectants.– Kiev: Naukova dumka, 1978.– 230 p.
6. *Schegoleva T.Yu.* Investigation of dielectric characteristics of bioobjects in a microwave range.– Kiev: Naukova dumka, 1996.– 187p.
7. *Schegoleva T.Yu.* Measurement of electric parameters of thin samples of polydispersal, liquid and solid dielectrics with high sorption in a microwave range // Radiotekhnika i elektronika.– 1981.– Vol. 24, N11.– P. 2328-2333.
8. *Schegoleva T.Yu., Kolesnikov V.G., Vasilieva E.V. et al.* Application of microwave range of radio waves in medicine.– Kharkov, 1999.– 233p.
9. *World Health Organisation*. Laboratory manual for examination of human semen and semen- cervical mucus interaction.– Cambridge: University Press.– 1997.– 22 p.

*Accepted in 30.03.2004*

*Поступила 30.03.2004*