

<https://doi.org/10.35339/msz.2019.85.04.04>  
УДК 612.616:57.086.13: 678.746.5+547.458.2

*О.В. Павлович, Г.О. Гапон, Т.О. Юрчук, М.П. Петрушко*

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків*

### **КРІОКОНСЕРВУВАННЯ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ЛЮДИНИ З ПРОНИКАЮЧИМИ І НЕПРОНИКАЮЧИМИ КРІОПРОТЕКТОРАМИ**

При лікуванні безпліддя методами допоміжних репродуктивних технологій широко використовують кріоконсервовані сперматозоїди. Проте частота виживання сперматозоїдів у пацієнтів з олігоастенотератозооспермією залишається низькою. У зв'язку з цим розробка ефективних способів кріоконсервування сперматозоїдів при патоспермії є актуальною. У дослідженні порівнювали ефективність кріоконсервування сперматозоїдів чоловіків при олігоастенотератозооспермії з використанням проникаючих і непроникаючих кріопротекторів. Після кріоконсервування оцінювали рухливість, життєздатність та морфологічні характеристики сперматозоїдів. Показано, що завдяки кріоконсервуванню з полівінілпіролідом зберігається (89,6±8,6) % життєздатних клітин із нормальними морфологічними характеристиками. Використання сперматозоїдів людини з полівінілпіролідом є перспективним для допоміжних репродуктивних технологій, оскільки можна використовувати сперматозоїди одразу після відігріву для запліднення ооцитів.

**Ключові слова:** кріоконсервування сперматозоїдів, рухливість, полівінілпіролідон, олігоастенотератозооспермія.

#### **Вступ**

Однією з першопричин чоловічого безпліддя є низька кількість сперматозоїдів та їхня незначна рухливість після кріоконсервування [1]. Для реалізації репродуктивної функції пацієнтів з олігоастенотератозооспермією (ОАТ) необхідним є застосування методик допоміжних репродуктивних технологій, важливим етапом яких є кріоконсервування [2–4]. При нормозооспермії як «золотий стандарт» прийнято спосіб повільного заморожування з використанням 5–10 % розчину гліцерину [5]. Основний принцип дії проникаючих кріопротекторів, до яких належить гліцерин, полягає в заміщенні внутрішньоклітинної води, яка є основною причиною пошкодження клітинних структур. Гліцерин, як і більшість кріопротек-

торів, чинить цитотоксичний вплив на клітини, тому після розморожування його необхідно видаляти з клітинної суспензії [6]. У зв'язку з цим актуальним є пошук кріопротекторів, які не потрібно видаляти після кріоконсервування.

Полівінілпіролідон (ПВП), який є продуктом полімеризації N1-вінілпіролідону й ацетилену, відноситься до класу штучних полімерів та проявляє гідрофільно-гідрофобні властивості. З огляду на добре розвинені гідратаційні властивості ПВП характер заморожування розчинів змінюється – процес кристалізації зміщується в більш низькотемпературну область. 10 % розчин ПВП використовується для спрощення мікроманіпуляцій зі сперматозоїдами, сповільнюючи їхню рухливість при інтрацитоплазматичній ін'єкції в ооцит (ICSI).

© О.В. Павлович, Г.О. Гапон, Т.О. Юрчук, М.П. Петрушко, 2019

**Мета дослідження** – порівняння ефективності криоконсервування сперматозоїдів чоловіків при ОАТ з використанням проникаючих та непроникаючих криопротекторів.

#### **Матеріал і методи**

Досліджували сперматозоїди чоловіків-донорів у віці від 20 до 40 років при ОАТ (n=11). Зразки оцінювали відповідно до рекомендацій ВООЗ [7]. Після розрідження еякуляту протягом 40 хв при 37 °С оцінювали сперміологічні характеристики за допомогою системи CASA [8]. Основними компонентами системи CASA були мікроскоп Olympus IX-71 (Olympus, Японія) з оптикою та позитивною фазовою контрастністю, відеокамера (CCD) та програмне забезпечення для обробки зображень (Sperm Class Analyzer – Automatic system of sperm analysis). Час вимірювання для CASA становив  $4 \times 2,6$  с, а частота дискретизації кадрів – 25 Гц.

Оцінювали вплив криоконсервування з використанням ПВП та гліцерину на морфофункціональний стан сперматозоїдів людини при патоспермії. Оцінювали рухливість, життєздатність та морфологічні характеристики криоконсервованих сперматозоїдів.

Активно-рухливу фракцію сперміїв отримували центрифугуванням еякуляту в градієнті щільності Sperm Gradiet Kit (Cook, США). Виділену фракцію сперміїв розподіляли на три групи: 1 – спермії, які криоконсервували двоетапним методом з 10 % розчином гліцерину; 2 – спермії, які криоконсервували двоетапним методом з 10 % ПВП; 3 – нативні спермії. Криозахисні розчини готували на середовищі Global total for fertilization («Life Global», США), яке містило 10 % сироватковий альбумін людини («Life Global», США).

Життєздатність сперміїв оцінювали за кількістю живих сперміїв, підрахованих у мазках, забарвлених еозин-нігрозином («Magarog», Іспанія). Для цього змішували рівні об'єми (по 10 мкл) барвника й суспензії сперміїв, перемішували та інкубували 30 с при 37 °С, після чого краплю переносили на знежирене предметне скло, робили мазок, висушували й досліджували під світловим мікроскопом із застосуванням імерсії.

Криоконсервування зразків проводили у криовіалах, об'єм суспензії становив від 10 до 50 мкл залежно від вихідних характеристик біоматеріалу. Час експозиції з сумішами

криопротекторів не перевищував 10 хв. Криовіали витримували 10 хв на відстані 10 см над дзеркалом рідкого азоту, після чого швидко занурювали у рідкий азот. Зразки відігрівали на водяній бані (40 °С).

Визначали рухливість та концентрацію сперматозоїдів після криоконсервування, кількість нерухливих (криволінійна швидкість,  $VCL < 5$  мкм/с), локально-рухливих ( $VCL = 5–25$  мкм/с) та активно-рухливих ( $VCL > 25$  мкм/с) сперматозоїдів.

Усі дослідження виконано з дотриманням правил біомедичної етики. На проведення досліджень отримано письмову, вільну та інформовану згоду пацієнтів. Для статистичної обробки використовували програму Excel (Microsoft, США). Дані наводили як середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення. При порівнянні двох вибірок застосовували t-критерій Фішера–Ст'юдента та програму Excel (Microsoft) при  $p \leq 0,05$ .

#### **Результати та їх обговорення**

Середня кількість сперматозоїдів у вихідному еякуляті становила ( $11,0 \pm 0,2$ ) млн/мл. Після виділення активно-рухливої фракції – ( $3,8 \pm 0,3$ ) млн/мл, з них ( $84,3 \pm 8,4$ ) % – активно-рухливих сперматозоїдів.

Після криоконсервування активно-рухливими залишилися ( $78,8 \pm 6,6$ ) % сперматозоїдів, які були криоконсервовані з гліцерином, та ( $41,4 \pm 8,1$ ) %, криоконсервованих із ПВП. Життєздатність зберегли ( $82,1 \pm 8,6$ ) та ( $89,6 \pm 8,6$ ) % сперміїв у групі 1 та 2 відповідно (рис. 1).

Для нівелювання цитотоксичного ефекту гліцерину останній видаляли шляхом подвійного центрифугування. Незважаючи на високу частоту виживання сперміїв у групі 1, після зазначеного етапу кількість рухливих сперміїв зменшилась до ( $27,3 \pm 4,8$ ) % (рис. 1, 2, а). Оскільки непроникаючі криопротектори не потрібно видаляти, рухливість сперматозоїдів зберігалась на тому самому рівні. Таким чином, використання ПВП дозволило отримати високу частоту виживання сперміїв (рис. 2, б). Результати CASA підтвердили, що кількість активно-рухливих сперміїв групи 1 після криоконсервування та видалення криопротектора істотно зменшилась. Кількість локально-рухливих сперміїв групи 2 перевищувала цей показник групи 1 (рис. 2).

При морфологічному аналізі виявлено, що частота аномалій голівки сперматозоїда до-

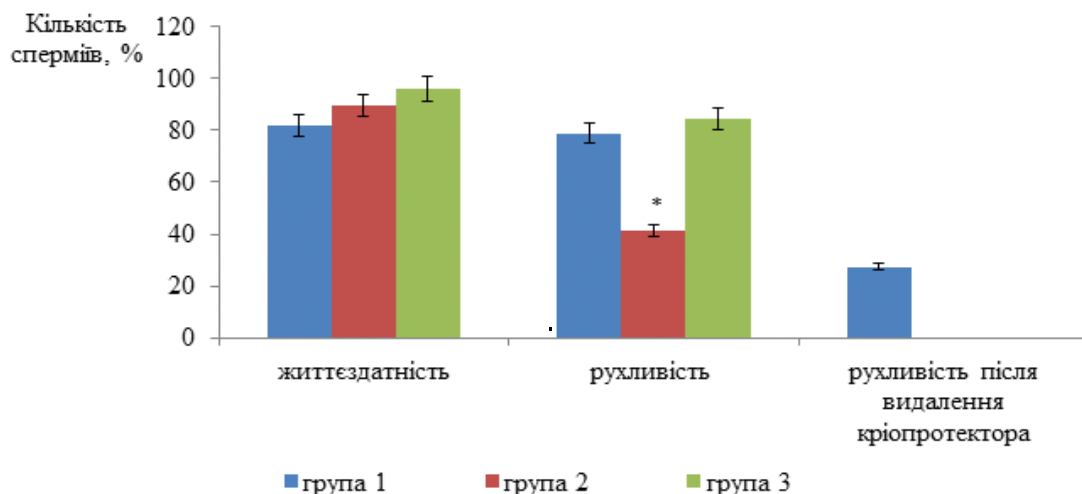


Рис. 1. Частота життєздатності, рухливості та рухливості після видалення криопротектора спермій груп 1–3: \* різниця значуща при порівнянні з показниками груп 1 та 3

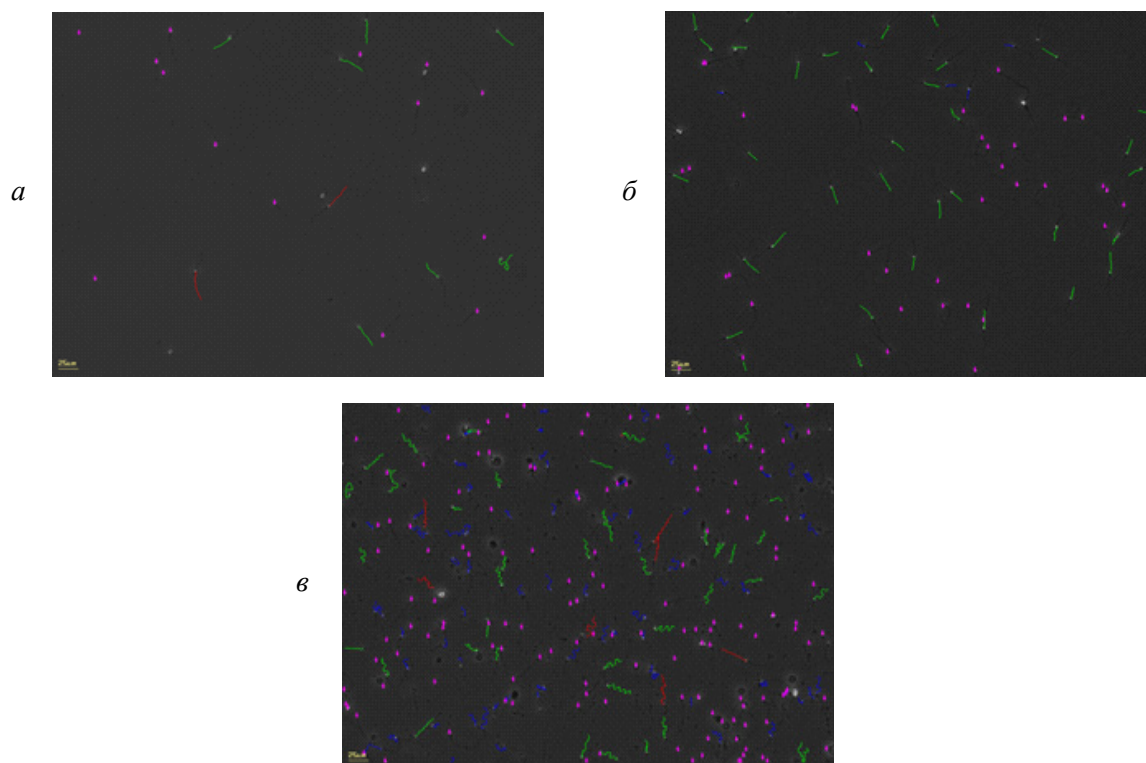


Рис. 2. Треки сперматозоїдів людини групи 1 (а) після криоконсервування та видалення криопротектора, групи 2 (б) та групи 3 (в): фіолетові – нерухомі, сині – із криволінійною швидкістю, зелені – локально-рухливі, червоні – активно-рухливі. Система аналізу зображень CASA

рівнювала ( $25,97 \pm 2,67$ ); ( $19,21 \pm 2,67$ ) та ( $20,57 \pm 1,19$ ) % для груп 1–3 відповідно (таблиця). У групі 1 серед усіх можливих варіантів патології голівки більшу частину становили сперматозоїди з однією великою або декількома маленькими вакуолями. Уважають, що кількість вакуолей, їхній розмір та форма відоб-

ражають дефекти на рівні компактизації ядра сперматозоїда [9]. Ембріони, утворені після запліднення ооцитів такими сперматозоїдами, не проходять репродуктивний добір, та їхній розвиток зупиняється на ранніх стадіях [10].

Частота аномалій шийки сперматозоїдів була незначною і становила ( $13,04 \pm 0,98$ ); ( $13,43 \pm$

*Морфологічні характеристики сперматозоїдів людини  
після кріоконсервування різними методами*

Показник	Група 1	Група 2	Група 3
Аномалії голівки	25,97±2,67*	19,21±2,67	20,57±1,19
Аномалії шийки	13,04±0,98	13,43±2,14	13,26±1,61
Аномалії хвоста	5,26±1,73	6,39±1,75	5,07±1,65
Змішана патологія	35,73±3,59*	26,26±2,61	24,88±2,44
Кількість нормальних форм	20,7±4,67*	34,56±4,14	36,000±3,869

\* Різниця значуща при порівнянні з показником групи 3,  $p < 0,05$ .

2,14) та (13,26±1,61) % для груп 1–3 відповідно. Різниця кількості сперматозоїдів із патологією хвоста була статистично незначуща.

Сукупність дефектів голівки, шийки та середньої частини була значущо нижче у сперматозоїдах після кріоконсервування з ПВП – (26,26±2,61) %, ніж у клітинах групи 1 – (35,73±3,59) %. У нативних сперматозоїдах цей показник становив (24,88±2,44) %.

Аномалії морфологічних характеристик можуть мати прогностичне значення щодо ефективності запліднення у програмах допоміжних репродуктивних технологій [11, 12]. Найпоширенішою вадою сперматозоїдів є дефекти голівки, а саме мікро- та макроцефалічна форма, глобулоспермія, відсутність акросоми, циліндрична та аморфна форми [13]. Їхнє клінічне значення описано багатьма авторами [14]. Показано, що ін'єкція в ооцит сперматозоїдів із вадами будови голівки збільшує частоту переривання вагітності, яка отримана в циклі допоміжних репродуктивних технологій із використанням методу ICSI [15]. У нашому дослідженні у групах 2 і 3 виникали різні форми аномалії голівки, тоді як у групі 1 мали місце одна велика або декілька малих вакуолей. Деякі автори вважають, що дефект зігнутої шийки визначається генетично і сперматозоїди з такою вагою мають поганий прогноз щодо їхньої запліднювальної здатності [16].

### Список літератури

1. Горпинченко І. І. Чоловіче безпліддя: етіологія, патогенез, діагностика та сучасні методи лікування / І. І. Горпинченко, М. Г. Романюк // Здоров'є чоловіка. – 2016. – № 1 (56). – С. 8–17. – Режим доступу до журн. :

[http://nbuv.gov.ua/UJRN/Zdmu\\_2016\\_1\\_3](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Zdmu_2016_1_3).

2. Фрагментація ДНК та процеси перекисного окислення ліпідів у сперміях людини при нормотатоспермії / М. Петрушко, Є. Павлович, В. Піняєв, Н. Волкова // Вісник Львівського університету. Серія Біологія. – 2016. – Вип. 74. – С. 97–103. – Режим доступу до журн. :

[http://nbuv.gov.ua/UJRN/VLNU\\_biol\\_2016\\_74\\_14](http://nbuv.gov.ua/UJRN/VLNU_biol_2016_74_14).

Серед аномалій хвостової частини найпоширенішою був синдром короткого хвоста, який детермінується генетично [17].

Вважають, що кріоконсервування може викликати структурні порушення плазмолем, акросоми та хвоста, які в подальшому знижують рухливість спермій [18]. Оскільки в нашій роботі як кріопротектори були застосовані речовини, які самі по собі знерухомлюють спермії, то ми не можемо стверджувати факт впливу структурних порушень на їхню рухливість. Проте, використовуючи спермії з еякулятів при ОАТ, ми звернули увагу на наявність перерахованих структурних відхилень у всіх досліджуваних групах.

### Висновки

Завдяки використанню полівінілпіролідону як кріопротектора частота виживання кріоконсервованих спермій при олігоастенотератозооспермії знаходиться на рівні 90 %. Сукупність дефектів голівки, шийки та середньої частини значущо нижче у сперматозоїдах після кріоконсервування з полівінілпіролідонем, ніж у сперматозоїдах зі стандартним способом із використанням гліцерину. Двоетапне кріоконсервування з полівінілпіролідонем є **перспективним** для допоміжних репродуктивних технологій, оскільки спермії для запліднення ооцитів можна використовувати негайно після відігріву без етапу видалення кріопротектора з клітин.

3. Apoptosis and processes of DNA fragmentation in native and cryopreserved human sperm cells at normo- and pathospermia / M. P. Petrushko, E. V. Pavlovich, V. I. Pinyaev [et al.] // *Cytology and Genetics*. – 2017. – Vol. 51 (4). – P. 278–281. – DOI : 10.3103/S0095452717040065.
4. *Петрушко М. П.* Сучасний стан проблеми кріоконсервування репродуктивних клітин та ембріонів людини. За матеріалами наукової доповіді на засіданні Президії НАН України 17 травня 2017 року / М. П. Петрушко // *Вісник НАН України*. – 2017. – № 7. – С. 44–52. – DOI : 10.15407/visn2017.07.044.
5. Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART / M. Di Santo, N. Tarozzi, M. Nadalini, A. Borini // *Adv. Urology*. – 2012. – Vol. 2012. – Article ID 854837. – DOI : 10.1155/2012/854837.
6. *Best B.* Cryoprotectant toxicity: facts, issues and questions / B. Best // *Rejuvenation Res.* – 2015. – Vol. 18 (5). – P. 422–436. – DOI : 10.1089/rej.2014.1656.
7. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. – [5<sup>th</sup> ed.]. – World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research, 2010. – 287 p.
8. *Afzelius B.* Electron microscopy of the sperm tail results obtained with a new fixative / B. Afzelius // *J. Bioph. Biochem. Cytol.* – 1959. – Vol. 5 (2). – P. 269–278. – PMID : 13654448. – PMCID : PMC2224653.
9. The prevalence of sperm with large nuclear vacuoles is a prognostic tool in the prediction of ICSI success / A. S. Setti, D. P. de Almeida Ferreira Braga, L. Vingris [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2014. – Vol. 31 (3). – P. 307–312. – DOI : 10.1007/s10815-013-0157-0.
10. Impact of high magnification sperm selection on neonatal outcomes: a retrospective study / O. Gaspard, P. Vanderzwalmen, B. Wirleitner [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2018. – Vol. 35 (6). – P. 1113–1121. – DOI : 10.1007/s10815-018-1167-8.
11. Ультрaструктурні та функціональні характеристики сперміїв людини після кріоконсервування методом вітрифікації / О. В. Павлович, Г. О. Гапон, Т. О. Юрчук [та ін.] // *Проблеми кріобіології та кріомедицини*. – 2020. – Т. 30, № 1. – С. 24–33. – DOI : doi.org/10.15407/cryo30.01.024.
12. *Colaco S.* Paternal factors contributing to embryo quality / S. Colaco, D. Sakkas // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2018. – Vol. 35 (11). – P. 1953–1968. – DOI : 10.1007/s10815-018-1304-4.
13. Automatic classification of human sperm head morphology / V. Chang, L. Heutte, C. Petitjean, S. Hartel, N. Hitschfeld // *Comput. Biol. Med.* – 2017. – Vol. 84. – P. 205–216. – DOI : 10.1016/j.compbimed.2017.03.029.
14. A dictionary learning approach for human sperm heads classification / F. Shaker, S. A. Monadjemi, J. Alirezaie, A. R. Naghsh-Nilchi // *Comput. Biol. Med.* – 2017. – Vol. 91. – P. 181–190. – DOI : 10.1016/j.compbimed.2017.10.009.
15. The correlation of sperm morphology with unexplained recurrent spontaneous abortion: A systematic review and meta-analysis / X. Cao, Y. Cui, X. Zhang [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – P. 55646–55656. – DOI : 10.18632/oncotarget.17233.
16. Sperm morphological abnormalities visualised at high magnification predict embryonic development, from fertilisation to the blastocyst stage, in couples undergoing ICSI / A. S. Setti, D. P. Braga, L. Vingris [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2014. – Vol. 31 (11). – P. 1533–1539. – DOI : 10.1007/s10815-014-0326-9.
17. Genetic abnormalities leading to qualitative defects of sperm morphology or function / P. F. Ray, A. Toure, C. Metzler-Guillemain [et al.] // *Clin. Genet.* – 2017. – Vol. 91 (2). – P. 217–232. – DOI : 10.1111/cge.12905.
18. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa / S. Ozkavukcu, E. Erdemli, A. Isik [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2008. – Vol. 25 (8). – P. 403–411. – DOI : 10.1007/s10815-008-9232-3.

## References

1. Horpinchenko I.I., Romaniuk M.H. (2016). Choloviche bezpliddia: etiolohiia, patohenez, diahnostyka ta suchasni metody likuvannia [Male infertility: etiology, pathogenesis, diagnostics and advanced methods of treatment]. *Choloviche zdoroviia – Men's Health*, vol. 1 (56), pp. 8–17. Retrieved from [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Zdmu\\_2016\\_1\\_3](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Zdmu_2016_1_3) [in Ukrainian].

2. Petrushko M.P., Pavlovich Ye.V., Pinyaev V.I., Volkova N. (2016). Fragmentatsiia DNK ta protsesy perekysnoho oksylennia lipidiv u spermiiakh liudyny pry normo- ta patospermii [Processes of DNA fragmentation and peroxidation of lipid spermatozoa in humans under the normospermia and pathospermia]. *Visnyk Lvivskoho universytetu. Seriia Biolohiia – Bulletin of Lviv University. Biology series*, vol. 74 (97), pp. 97–103. Retrieved from [http://nbuv.gov.ua/UJRN/VLNU\\_biol\\_2016\\_74\\_14](http://nbuv.gov.ua/UJRN/VLNU_biol_2016_74_14) [in Ukrainian].
3. Petrushko M.P., Pavlovich Ye.V., Pinyaev V.I., Volkova N.A., Podyfaliy V.V. (2017). Apoptosis and processes of DNA fragmentation in native and cryopreserved human sperm cells at normo- and pathospermia. *Cytology and Genetics*, vol. 51 (4), pp. 278–281, DOI 10.3103/S0095452717040065.
4. Petrushko M.P. (2017). Suchasnyi stan problemy kriokonservuvannia reproduktyvnykh klityn ta embrioniv liudyny. Za materialamy naukovoi dopovidi na zasidanni Prezydii NAN Ukrainy 17 travnia 2017 roku [Current state of cryopreservation of reproductive cells and embryos. According to the scientific report at the meeting of the Presidium of the NAS of Ukraine on May 17, 2017]. *Visnyk NAN Ukrainy – Bulletin of the NAS of Ukraine*, № 7, pp. 44–52, DOI 10.15407/visn2017.07.044 [in Ukrainian].
5. Di Santo M., Tarozzi N., Nadalini M., Borini A. (2012). Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Adv. Urology*, vol. 2012, article ID 854837, DOI 10.1155/2012/854837.
6. Best B. (2015). Cryoprotectant toxicity: facts, issues and questions. *Rejuvenation Res.*, vol. 18 (5), pp. 422–436, DOI 10.1089/rej.2014.1656.
7. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (5<sup>th</sup> ed.). (2010). World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research, 287 p.
8. Afzelius B. (1959). Electron microscopy of the sperm tail results obtained with a new fixative. *J. Bioph. Biochem. Cytol.*, vol. 5 (2), pp. 269–278, PMID 13654448, PMCID PMC2224653.
9. Setti A.S., de Almeida Ferreira Braga D.P., Vingris L., de Cassia Savio Figueira R., Iaconelli A.Jr., Borges E.Jr. (2014). The prevalence of sperm with large nuclear vacuoles is a prognostic tool in the prediction of ICSI success. *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 31 (3), pp. 307–312, DOI 10.1007/s10815-013-0157-0.
10. Gaspard O., Vanderzwalmen P., Wirleitner B., Ravet S., Wenders F., Eichel V., Mockova A. et al. (2018). Impact of high magnification sperm selection on neonatal outcomes: a retrospective study. *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 35 (6), pp. 1113–1121, DOI 10.1007/s10815-018-1167-8.
11. Pavlovych O.V., Hapon H.O., Yurchuk T.O., Riepin M.V., Marchenko L.M., Hovorukha T.P., Petrushko M.P. (2020). Ultrastrukturni ta funktsionalni kharakterystyky spermiiiv liudyny pislia kriokonservuvannia metodom vitryfikatsii [Ultrastructural and functional characteristics of human spermatozoa after cryopreservation by vitrification]. *Problemy kriobiologii i kriomedycyny – Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, vol. 30, № 1, pp. 24–33, doi.org/10.15407/cryo30.01.024.
12. Colaco S., Sakkas D. (2018). Paternal factors contributing to embryo quality. *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 35 (11), pp. 1953–1968, DOI 10.1007/s10815-018-1304-4.
13. Chang V., Heutte L., Petitjean C., Hartel S., Hirschfeld N. (2017). Automatic classification of human sperm head morphology. *Comput. Biol. Med.*, vol. 84, pp. 205–216, DOI 10.1016/j.compbiomed.2017.03.029.
14. Shaker F., Monadjemi S.A., Alirezaie J., Naghsh-Nilchi A.R. (2017). A dictionary learning approach for human sperm heads classification. *Comput. Biol. Med.*, vol. 91, pp. 181–190, DOI 10.1016/j.compbiomed.2017.10.009.
15. Cao X., Cui Y., Zhang X., Lou J., Zhou J., Wei R. (2017). The correlation of sperm morphology with unexplained recurrent spontaneous abortion: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, vol. 8, № 33, pp. 55646–55656, DOI 10.18632/oncotarget.17233.
16. Setti A.S., Braga D.P., Vingris L., Serzedello Th., de Cassia Savio Figueira R., Iaconelli Jr.A., Borges Jr. E. (2014). Sperm morphological abnormalities visualised at high magnification predict embryonic development, from fertilisation to the blastocyst stage, in couples undergoing ICSI. *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 31 (11), pp. 1533–1539, DOI 10.1007/s10815-014-0326-9.
17. Ray P.F., Toure A., Metzler-Guillemain C., Mitchell M.J., Arnoult C., Coutton C. (2017). Genetic abnormalities leading to qualitative defects of sperm morphology or function. *Clin. Genet.*, vol. 91 (2), pp. 217–232, DOI 10.1111/cge.12905.
18. Ozkavukcu S., Erdemli E., Isik A., Oztuna D., Karahuseyinoglu S. (2008). Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 25 (8), pp. 403–411, DOI 10.1007/s10815-008-9232-3.

*Е.В. Павлович, А.А. Гапон, Т.А. Юрчук, М.П. Петрушко*

#### **КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА С ПРОНИКАЮЩИМИ И НЕПРОНИКАЮЩИМИ КРИОПРОТЕКТОРАМИ**

При лечении бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий широко используют криоконсервированные сперматозоиды. Однако частота выживания сперматозоидов у пациентов с олигоастенотератозооспермией остается низкой. В связи с этим разработка эффективных способов криоконсервирования сперматозоидов при патоспермии является актуальной. В исследовании сравнивали эффективность криоконсервирования сперматозоидов мужчин при олигоастенотератозооспермии с применением проникающих и непроникающих криопротекторов. После криоконсервирования оценивали подвижность, жизнеспособность и морфологические характеристики сперматозоидов. Показано, что благодаря криоконсервированию с поливинилпирролидоном сохранится  $(89,6 \pm 8,6) \%$  жизнеспособных клеток с нормальными морфологическими характеристиками. Криоконсервирование спермиев человека с поливинилпирролидоном является перспективным для вспомогательных репродуктивных технологий, поскольку можно использовать сперматозоиды сразу после отогрева для оплодотворения ооцитов.

**Ключевые слова:** криоконсервирование сперматозоидов, подвижность, поливинилпирролидон, олигоастенотератозооспермия.

*E. Pavlovich, G. Gapon, T. Yurchuk, M. Petrushko*

#### **CRYOPRESERVATION OF HUMAN SPERMATOZOA WITH PENETRATING AND NON-PENETRATING CRYOPROTECTANTS**

Cryopreserved spermatozoa are widely used in infertility treatment by assisted reproductive technologies. However, the spermatozoa survival rate remains low in patients with oligoastenoteratozoospermia. Therefore the development of effective cryopreservation methods for spermatozoa from pathospermia is relevant. The effectiveness of cryopreservation spermatozoa from oligoastenoteratozoospermia man using penetrating and non-penetrating cryoprotectants was compared. Sperm motility, viability and morphological characteristics were evaluated after cryopreservation with glycerol and polyvinylpyrrolidone. The average number of spermatozoa count in fresh ejaculate was  $(11.0 \pm 0.2)$  mln/ml. After isolation of active motile fraction the number of cells was  $(3.8 \pm 0.3)$  mln/ml and  $(84.3 \pm 8.4) \%$  from them were motile (group 3).  $(78.8 \pm 6.6) \%$  of spermatozoa cryopreserved with glycerol (group 1) and  $(41.4 \pm 8.1) \%$  cryopreserved with polyvinylpyrrolidone (group 2) remained active motile. The spermatozoa viability after cryopreservation was  $(82.1 \pm 8.6) \%$  and  $(89.6 \pm 8.6) \%$  in group 1 and 2, respectively. Despite the high rate of spermatozoa survival in group 1 the number of motile cells decreased to  $(27.3 \pm 4.8) \%$  after cryoprotectant removing stage. Morphological analysis revealed that the incidence of spermatozoa head abnormalities was  $(25.97 \pm 2.67)$ ,  $(19.21 \pm 2.67)$  and  $(20.57 \pm 1.19) \%$  in group 1–3, respectively. The differences of spermatozoa midpiece and tail abnormalities in the study groups were statistically insignificant. The use of polyvinylpyrrolidone as a cryoprotectant allows preserving 90 % of survived spermatozoa from oligoastenoteratozoospermia men after freeze/thawing. The set of spermatozoa head, neck and midpiece abnormalities is significantly lower after cryopreservation with polyvinylpyrrolidone compared with routine method with glycerol. Two-stage spermatozoa cryopreservation method with polyvinylpyrrolidone is promising for assisted reproductive technologies since spermatozoa can be used immediately after warming for oocyte fertilization without cryoprotectant removing step.

**Keywords:** spermatozoa cryopreservation, motility, polyvinylpyrrolidone, oligoastenoteratozoospermia.

Надійшла 05.12.19

#### **Відомості про авторів**

*Павлович Олена Володимирівна* – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник відділу кріобіології системи репродукції Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Адреса: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Тел.: +38(098)374-20-11.

E-mail: lenapavlovich@gmail.com.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0019-7742>.

*Гапон Ганна Олександрівна* – молодший науковий співробітник відділу кріобіології системи репродукції Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Адреса: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Тел.: +38(057)373-74-35.

E-mail: skag2005@yandex.ua.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9372-3213>.

*Юрчук Таїсія Олександрівна* – кандидат біологічних наук, завідувач лабораторії кріоконсервування гамет та ембріонів відділу кріобіології системи репродукції Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Адреса: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Тел.: +38(057)373-74-35.

E-mail: taisiya.yur@gmail.com.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4993-9129>.

*Петрушко Марина Павлівна* – доктор біологічних наук, провідний науковий співробітник, завідувач відділу кріобіології системи репродукції Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Адреса: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Тел.: +38(057)373-74-35.

E-mail: petrushkomarina@gmail.com.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8331-5419>.