Probl Cryobiol Cryomed 2019; 29(2):178
https://doi.org/10.15407/cryo29.02.178

Ультраструктурні характеристики сперміїв людини після кріоконсервування шляхом вітрифікації з полівінілпіралідоном

Г.О. Гапон, О.В. Павлович, Т.О. Юрчук, М.В. Рєпін, Л.М. Марченко
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Ultrastructural Characteristics of Human Sperm After Cryopreservation with Polyvinylpyralidon by Vitrification

H.O. Hapon, O.V. Pavlovich, T.O. Yurchuk, M.V. Repin, L.M. Marchenko
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv

Кріоконсервування сперміїв широко використовують при лікуванні безпліддя методами допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ). У клінічній практиці для виконання інтрацитоплазматичної ін'єкції (ІКСІ) в ооцит застосовується 10% полівінілпіралідон (ПВП), який сповільнює рухливість сперміїв. У той самий час ПВП є непроникаючим кріопротектором, який може бути ефективним агентом під час кріоконсервування шляхом вітрифікації поодиноких сперміїв. Однак його вплив на цитоархітектоніку гамет, збереження якої є дуже важливим для успішного запліднення, наразі не вивчено.

Мета дослідження – вивчення впливу кріоконсервування шляхом вітрифікації з полівінілпіралідоном на ультраструктурні характеристики сперміїв людини.

У роботі досліджено зразки еякулятів за інформованою згодою чоловіків-донорів віком від 20–40 років із діагнозом олігоастенозооспермія. Дослідження узгоджено з комітетом із біоетики ІПКіК НАН України (м. Харків). Еякулят оцінювали відповідно до рекомендацій ВООЗ. Ультраструктурні характеристики вивчали у свіжовиділених (група 1) та кріоконсервованих (група 2) сперміях. До виділених сперміїв додавали 7%-й розчин ПВП, аліквоти вносили до мікросоломинок, які запаювали та занурювали у рідкий азот. Зразки відігрівали на водяній бані (37°С) впродовж хвилини.

Кількість життєздатних сперміїв підраховували в мазках за забарвленням еозин-нігрозином. Для електронної мікроскопії зразки фіксували, отримували ультратонкі зрізи та аналізували за допомогою електронного мікроскопа «ПЕМ-125К» («SELMI», Україна). Аналізували морфологічні та ультраструктурні характеристики голівки: наявність або відсутність акросоми, положення та форма акросоми, форма ядра, стан хроматину, особливості ультраструктури мітохондрій та матриксу. Життєздатність сперміїв після відігріву складала (87,1 ± 7,3)%, кількість рухливих сперміїв – (42,3 ± 6,7)%. У кріоконсервованих сперміях частіше спостерігали зміни акросом, насамперед, набухання, яке характеризується відривом внутрішньої мембрани від ядерної оболонки, та розширення субакросомального простору. Такі особливості будови було виявлено у (2,8 ± 0,4) та (6,3 ± 0,5)% сперматозоїдів групи 1 та 2 відповідно. У досліджуваних групах кількість сперміїв з морфологічними змінами в зоні шийки та хвоста значуще не відрізнялась.

Таким чином, кріоконсервування сперміїв людини шляхом вітрифікації з 7% ПВП дозволяє зберегти їх ультраструктурні характеристики на рівні свіжовиділених із зони шийки та хвоста.

Cryopreservation of sperm is widely used in infertility treatment by assisted reproductive technologies (ART). At embryonic stage of the ART, to simplify micromanipulation with sperm, slowing down their mobility an intracytoplasmic injection into an oocyte 10% of polyvinylpyralidon (PVP) is used. At the same time PVP is a non-penetrating cryoprotectant, which can be appplied to vitrify single spermatozoa. However its influence on the ultrastructure of gametes, which is very important for fertilization, has not yet been studied.

The research purpose was to study the effects of cryopreservation with PVP by vitrification on ultrastructural characteristics of human sperm.

In this work, the ejaculate samples were evaluated with an informed consent of donors (aged from 20 to 40 years) with oligoasthenozoospermia. The study was aproved by the Committee in Bioethics of the IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine. An jaculate was assessed in accordance with the WHO recommendations. Ultrasound characteristics were studied in fresh sperm (group 1) and cryopreserved sperm (group 2). PVP solution of 7% was added to isolated sperm then added to a microstraw, which was sealed and plugged into liquid nitrogen. The samples were warmed at water bath (37°C) for 1 min.

The number of viable sperm cells counted in smears by eosin-nigrosin staining. For electron microscopy, the specimens were fixed, ultrathin sections were obtained and analyzed using an electron microscope PEM-125K (SELMI, Ukraine). The morphological and ultrastructural characteristics of the head were analyzed: the presence or absence of acrosomes, the position and shape of acrosomes, the shape of nucleus, state of chromatin, features of ultrastructure of mitochondria and matrix. The survival rate of sperm after warming was (87.1 ± 7.3)%. The number of motile sperm made (42.3 ± 6.7). The changes in acrosome were more frequent in cryopreserved sperm, primarily that was swelling, characterized by separation of internal membrane from the nuclear shell and expansion of subacrosomal space. Such features of the structure were revealed in the spermatozoa of (2.8 ± 0.4) and (6.3 ± 0.5)% groups 1 and 2, respectively). In the studied groups, there was no significant difference in the number of sperm with morphological changes in the neck and tail area.

Thus, cryopreservation of human sperm by vitrification with 7% PVP allowed to preserve their ultrastructural characteristics at the level of freshy isolated in the area of the neck and tail.