

UDC 612.616:57.086.13:-678.746.5+547.458.2

О.В. Павлович^{1*}, Г.О. Гапон¹, Т.О. Юрчук¹,
М.В. Рєпін², Л.М. Марченко², Т.П. Говоруха², М.П. Петрушко¹

Ультраструктурні та функціональні характеристики сперміїв людини після кріоконсервування методом вітрифікації

UDC 612.616:57.086.13:-678.746.5+547.458.2

O.V. Pavlovych^{1*}, H.O. Hapon¹, T.O. Yurchuk¹, M.V. Repin²,
L.M. Marchenko², T.P. Govorukha², M.P. Petrushko¹

Ultrastructural and Functional Characteristics of Human Spermatozoa After Cryopreservation by Vitrification

Реферат: Низькотемпературне консервування сперматозоїдів широко використовується при лікуванні безпліддя методами допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ). Методи кріоконсервування сперматозоїдів із еякулятів при нормозооспермії є рутинними, проте їх неможливо використовувати для сперматозоїдів, отриманих із еякулятів при вадах сперматогенезу. Розроблення методів кріоконсервування та оцінка морфофункціональних та ультраструктурних характеристик сперматозоїдів після кріоконсервування є актуальними. У роботі оцінювали вплив кріоконсервування методом вітрифікації з використанням непроникальних кріопротекторів полівінілпіролідону (ПВП) та сахарози на морфофункціональний та ультраструктурний стан сперматозоїдів людини при патоспермії. У (22,3 ± 3,4), (26,8 ± 4,2), (18,6 ± 2,1)% сперміїв після вітрифікації з 0,25 М сахарозою; 10% ПВП та сумішшю 0,25 М сахарози, 10% ПВП, 10% сироваткового альбуміну людини відповідно, спостерігали виникнення вакуолей у хроматині ядер сперматозоїдів. Для свіжовиділених сперматозоїдів цей показник становив (16,6 ± 1,4)%. У досліджувальних групах ультраструктурні характеристики акросоми, аксонем, періаксонемальних структур та джгутіка сперматозоїдів суттєво не відрізнялися від контрольних зразків. Показано, що кріоконсервування сперматозоїдів людини методом вітрифікації з використанням розчинів сахарози та ПВП дозволяє зберегти їх життєздатність та ультраструктурну цілісність та є перспективним для використання у ДРТ.

Ключові слова: сперматозоїди, кріоконсервування, вітрифікація, полівінілпіролідон, астенозооспермія.

Реферат: Низькотемпературное консервирование сперматозоидов широко используется при лечении бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Методы криоконсервирования сперматозоидов из эякулятов при нормозооспермии являются рутинными, однако их невозможно использовать для сперматозоидов, полученных из эякулятов при патологиях сперматогенеза. Разработка методов криоконсервирования и оценка морфофункциональных и ультраструктурных характеристик сперматозоидов после криоконсервирования актуальны. В работе оценивали влияние криоконсервирования методом витрификации с использованием непроникающих криопротекторов поливинилпирролидона (ПВП) и сахарозы на морфофункциональное и ультраструктурное состояние сперматозоидов человека при патоспермии. В (22,3 ± 3,4), (26,8 ± 4,2), (18,6 ± 2,1)% спермиев после витрификации с 0,25 М сахарозой; 10% ПВП и смесью 0,25 М сахарозы, 10% ПВП, 10% сывороточного альбумина человека соответственно, наблюдали возникновение вакуолей в хроматине ядер сперматозоидов. Для свежеевыделенных сперматозоидов этот показатель составлял (16,6 ± 1,4)%. В исследуемых группах ультраструктурные характеристики акросомы, аксонемы, периаksonемальных структур и жгутика сперматозоидов существенно не отличались от контрольных образцов. Показано, что криоконсервирование сперматозоидов человека методом витрификации с растворами сахарозы и ПВП позволяет сохранить их жизнеспособность и ультраструктурную целостность и перспективно для использования в ВРТ.

Ключевые слова: сперматозоиды, криоконсервирование, витрификация, поливинилпирролидон, астенозооспермия.

Abstract: Low temperature preservation of spermatozoa is widely applied in infertility treatment when using the assisted reproductive technology (ART). There are the standard methods for cryopreservation of ejaculated spermatozoa in normozoospermia, but their application for ejaculate-derived spermatozoa, having spermatogenesis defects, is impossible. Therefore, of high priority are to design the cryopreservation methods and assess morphofunctional and ultrastructural characteristics of spermatozoa after cryopreservation. Here, we have evaluated the impact of cryopreservation by vitrification using non-penetrating cryoprotectants of polyvinylpyrrolidone (PVP) and sucrose on morphofunctional and ultrastructural state of human spermatozoa in pathospermia. In (22.3 ± 3.4), (26.8 ± 4.2), (18.6 ± 2.1)% of spermatozoa after vitrification with 0.25M sucrose; 10% PVP and a mixture of 0.25 M sucrose, 10% PVP, 10% human serum albumin, respectively, we have observed the appearance of vacuoles in nuclear chromatin of spermatozoa. For freshly isolated spermatozoa this index was (16.6 ± 1.4)%. In the studied groups, the ultrastructural characteristics of acrosome, axoneme, periaxonemal structures, and spermatozoa flagella did not significantly differ from the control samples. The cryopreservation of human spermatozoa by vitrification using sucrose and PVP solutions was shown to preserve their viability and ultrastructural integrity and to be promising in ART.

Key words: spermatozoa, cryopreservation, vitrification, polyvinylpyrrolidone, asthenozoospermia.

¹Відділ кріобіології системи репродукції

²Лабораторія кріоморфології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: lenapavlovich@gmail.com

Надійшла 28.03.2019

Прийнята до друку 11.02.2020

¹Department of Cryobiology of Reproductive System

²Laboratory of Cryomorphology Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: lenapavlovich@gmail.com

Received 28, March, 2019

Accepted 11, February, 2020

Кріоконсервування спермійів широко застосовується в програмах допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) [2]. Останнім часом перевага надається вітрифікації, який реалізується за значних концентрацій кріопротекторів та надвисоких швидкостей охолодження. Такий метод є перспективним для клінічного використання, оскільки він не потребує коштовного обладнання та не вимагає тривалого часу кріоконсервування [11–15]. На даний час найбільш поширеним є повільне заморожування, хоча неодноразово було показано його негативний вплив як на структурні, так і на функціональні характеристики сперматозоїдів [6]. Чи є вітрифікація альтернативою повільному заморожуванню? Показано, що кріоконсервування сперматозоїдів методом вітрифікації, порівняно з повільним заморожуванням, дозволило отримати вищу частоту їх виживання [12]. Висока в'язкість внутрішньоклітинного середовища сперматозоїдів внаслідок малого об'єму води і високого вмісту білків, нуклеотидів і цукрів сприяє їх вітрифікації при надвисоких швидкостях охолодження. Деякі дослідники вважають, що цитотоксичність загальноновживаних кріопротекторів (диметилсульфоксид, пропандіол, етиленгліколь) при використанні у високих концентраціях є основним недоліком для застосування вказаного методу у клінічній практиці [15, 16]. При цьому F. Nawroth та співавт. [17] одержали позитивні результати вітрифікації сперматозоїдів без використання кріопротекторів, проте в наших експериментах їх відтворити не вдалося. Сахарозу широко застосовують для кріоконсервування спермійів, оскільки вона не цитотоксична та не потребує видалення з клітин. Полівінілпіролідон (ПВП) відноситься до класу штучних полімерів і є продуктом полімеризації N1-вінілпіролідону та ацетилену. На ембріологічному етапі ДРТ 10% ПВП використовують для спрощення мікрomanipуляцій зі сперматозоїдами, сповільнюючи їх рухливість під час інтрацитоплазматичної ін'єкції в ооцит. У той самий час ПВП є непроникаючим кріопротектором, дія якого на сперматозоїди на сьогодні не визначена.

Мета дослідження – оцінка впливу кріоконсервування методом вітрифікації з використанням полівінілпіролідону та сахарози на морфологічний та ультраструктурний стан сперматозоїдів людини при астенозооспермії.

Матеріали і методи

У роботі досліджували зразки еякулятів чоловіків-донорів у віці від 20 до 40 років при астенозооспермії ($n = 10$). Усі маніпуляції з біо-

Spermatozoa cryopreservation is widely used in the assisted reproductive technology (ART) programs [16]. Recently, the preference is shown to the vitrification, realized with highly concentrated cryoprotectants and ultra-high cooling rates. This method is promising for clinical application since neither expensive equipment nor long time of cryopreservation are needed [7–11]. Currently, a slow freezing is the most common way, but its negative effect was frequently shown on both structural and functional characteristics of spermatozoa [2]. Can the vitrification be an alternative to slow freezing? The spermatozoa cryopreservation by vitrification, was shown to provide a higher survival rate as compared with slow freezing [8]. A high viscosity of intracellular environment of spermatozoa due to a low amount of water and large one of proteins, nucleotides and sugars contributes to their vitrification at extremely high cooling rates. Some researchers suggest the cytotoxicity of commonly used cryoprotectants (DMSO, propanediol, ethylene glycol) used at high concentrations to be the main disadvantage for applying this method in clinical practice [11, 13]. Herewith, Nawroth F. *et al.* [14] have reported about positive findings on the cryoprotectant-free spermatozoa vitrification, but we did not manage to reproduce them in our experiments. The sucrose is widely used for spermatozoa cryopreservation owing to its non-cytotoxicity and no need to be removed from cells. Polyvinylpyrrolidone (PVP) belongs to artificial polymers and is a product of polymerization of N1-vinylpyrrolidone and acetylene. At an embryological stage of ART, 10% PVP is used to facilitate micromanipulations with spermatozoa, by slowing down their motility during intracytoplasmic injection into oocyte. At the same time, PVP is a non-penetrating cryoprotectant, the effect of which on spermatozoa has not been determined yet.

The research aim was to evaluate the impact of cryopreservation by vitrification using polyvinylpyrrolidone and sucrose on morphofunctional and ultrastructural states of human spermatozoa in asthenozoospermia.

Materials and methods

Here, we have studied the samples of ejaculates collected from men aged between 20 to 40 years with asthenozoospermia ($n = 10$). All the biomaterial manipulations were performed in accordance with the European Protocol on the Protection of Human Embryos *In Vitro* CDBI-CO-GT3 of the Steering Committee on Bioethics (Strasbourg, 2003), and by the decision of the Bioethics Com-



матеріалом виконували згідно з Європейським протоколом із захисту ембріонів *in vitro* CDBI-CO-GT3 Керівного комітету з біоетики (Страсбург, 2003), рішенням Комітету з біоетики Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України (м. Харків) та за інформованою згодою пацієнтів. Дослідження проводили відповідно до принципів Гельсінської декларації з прав людини. Оцінку еякуляту проводили відповідно до рекомендацій ВООЗ [21]. Еякулят збирали методом мастурбації в стерильні бюкси. Після розрідження біоматеріалу протягом 40 хв при 37°C візуально оцінювали кількість спермійів в еякуляті зі швидким та повільним прямолінійним рухом [1]. Концентрацію і рухливість спермійів визначали в камері «Makler» («Sefi medical instrument», Ізраїль) під світловим мікроскопом «Olympus IX-71» («Olympus», Японія).

Методом центрифугування при 834g в градієнті щільності та при процедурі «swim up» з еякуляту пацієнта виділяли спермії зі швидким і повільним прямолінійним рухом та розділяли на експериментальні групи залежно від складу кріопротекторних сумішей (КС): 1 – сахароза 0,25 М («Sigma-Aldrich», США) та 10% сироваткового альбуміну людини (HSA) («Life Global», США); 2 – 10% ПВП («Cook», США); 3 – сахароза 0,25 М, 10% ПВП та 10% HSA; 4 – нативні спермії. Кріозахисні середовища готували на фосфатно-буферному розчині Хенкса («PAA», Австрія). До суспензії сперматозоїдів обережно додавали кріозахисний розчин та переносили у мікросоломинки. Об'єм зразка складав 50 мкл. Час експозиції з сумішами кріопротекторів не перевищував 30 хв. Мікросоломинки швидко занурювали у рідкий азот. Зразки відігрівали на водяній бані (37°C). Після відігріву кріопротектор не видаляли.

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

Для електронної мікроскопії зразки фіксували в 3%-му розчині глутарового альдегіду («SPI», США) на фосфатному буфері Міллоніга та 1%-му розчині чотириокису осмію («SPI») [10], після зневоднення етанолом («Укрспирт», Україна) та оксипропіленом («SPI») переносили в епон-аралдіт («SPI»). Для електронно-мікроскопічного дослідження отримували ультра-

mittee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv) and with the informed consent of patients. The research was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki on Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. The ejaculates were assessed according to the WHO recommendations [21]. The ejaculate samples were collected by masturbation into sterile tubes. After biomaterial dilution for 40 min at 37°C, the number of spermatozoa in ejaculate with rapid and slow forward movement was visually estimated [3]. The spermatozoa concentration and motility were determined in Makler counting chamber (Sefi Medical Instrument, Israel) with Olympus IX-71 light microscope (Olympus, Japan).

Using the density gradient centrifugation at 834g and 'swim up' procedure, we isolated the spermatozoa with rapid and slow forward movements from patient's ejaculate and then divided into the following experimental groups, depending on cryoprotectant mixture (CM) composition: the group 1 – 0.25 M sucrose (Sigma-Aldrich, USA) and 10% human serum albumin (HSA) (Life Global, USA); group 2 – 10% PVP (Cook, USA); group 3 – 0.25 M sucrose, 10% PVP and 10% HSA; group 4 – native spermatozoa. The cryoprotective media were prepared with Hank's buffered salt solution (PAA, Austria). The spermatozoa suspension was carefully supplemented with cryoprotective solution and transferred into microstraws. The sample's volume was 50 μ l. The exposure time with cryoprotectant mixtures did not exceed 30 min. The microstraws were rapidly immersed into liquid nitrogen. The samples were thawed in a water bath (37°C). The cryoprotectant was not removed after thawing.

Spermatozoa viability was assessed by the number of living spermatozoa counted in smears stained with eosin-nigrosine (Magapor, Spain). To do that, the equal volumes (10 μ l) of dye and spermatozoa suspension were mixed, then stirred and incubated for 30 s at 37°C. Afterwards a drop was transferred onto a non-degreased slide, then smeared, dried and examined with light microscope using immersion.

For electron microscopy, the specimens were fixed in 3% glutaraldehyde solution (SPI, USA) on Millonig's phosphate buffer and 1% osmium tetroxide (SPI) [6], after dehydration with ethanol (Ukrspirit, Ukraine) and oxypropylene (SPI) they were transferred into epon-araldite (SPI). For electron microscopic examination the ultrathin sections were obtained, then contrasted with



тонкі зрізи, контрастували ураніацетатом («Інтерхім», Росія) і цитратом свинцю («SPI»). Зразки аналізували за допомогою електронного мікроскопа «ПЕМ-125К» («SELMI», Україна), оснащеною системою з'йомки та аналізу зображення CAI-01A («SELMI»), яке включало також CCD-камеру «DX-2» («Карра», Німеччина) і пакет програм («Карра») [4].

Проводили аналіз ультраструктурних характеристик голівки спермія (наявність або відсутність акросоми, форма акросоми (нормальна або змінена), стан хроматину), шийки (наявність центріолі та форма мітохондрій) та хвостової частини (стан мікротрубочок та фіброзного шару).

Стан ДНК сперміїв оцінювали за допомогою акридину помаранчового (АП) («Sigma-Aldrich»), який дає зелене флуоресцентне світіння, коли зв'язується з подвійним ланцюгом ДНК та червоним – з одноланцюговим [9, 20].

Для статистичної обробки даних використовували програму «Excel» («Microsoft», США). Дані наводили як середнє значення \pm стандартне відхилення. Для порівняння двох вибірок застосовували t-критерій Фішера-Ст'юдента та програму «Excel» («Microsoft») при $p \leq 0,05$.

Результати та обговорення

Після кріоконсервування методом вітрифікації у групах 1–3 життєздатними виявилися (86,1 \pm 6,7); (87,1 \pm 7,3); (89,6 \pm 7,5) % сперміїв відповідно та (97,6 \pm 7,5) у групі 4. Кількість рухливих сперміїв в аналізованих групах становила (65,9 \pm 6,8), (42,5 \pm 6,7), (41,3 \pm 8,1) та (85,6 \pm 6,7) % відповідно (рис. 1). Зниження показника рухливості сперміїв у групах 1–3 по відношенню до групи 4 може бути пов'язано з тим, що ПВП та сахароза, які присутні у складі КС, є полімерами та характеризуються підвищеною в'язкістю. Рух сперміїв у зазначених середовищах сповільнюється аж до повного знерухомилення, проте вони залишаються життєздатними.

Морфологічний аналіз сперматозоїдів методом світлової мікроскопії виявив, що після кріоконсервування частка рухливих сперматозоїдів із нормальною морфологією незначно збільшилася порівняно зі свіжовиділеною фракцією (35,6 \pm 5,5), (33,2 \pm 4,7), (36,6 \pm 4,3) % у групах 1–3 відповідно, проти (30,7 \pm 1,5) % у групі 4, що може бути пов'язано з кріоселекцією.

Для стандартного аналізу сперматозоїдів використовували світлову мікроскопію, яка дозволяє визначити їх морфологічні особливості: кількість голівок та хвостів сперміїв, їх розміри та відносне розташування, наявність та розміри акросоми. Ультраструктурне дослідження дає

uranyl acetate (Interkhim, Russia) and lead citrate (SPI). The specimens were analyzed using a TEM-125K electron microscope (SELMI, Ukraine) equipped with CAI-01A imaging and analysis system (SELMI), also included DX-2 CCD camera with Kappa camera control software (Kappa, Germany) [19].

The ultrastructural characteristics of spermatozoa head (presence or absence of acrosome, its shape (normal or altered), chromatin state), neck (presence of centrioles and mitochondrial shape) and tail part (state of microtubules and fibrous layer) were analyzed.

The state of spermatozoa DNA was evaluated using acridine orange (AO) (Sigma-Aldrich, USA), which fluoresces green and red when binding to a double- or single-stranded DNA, respectively [5, 20].

The data were statistically processed using Excel software (Microsoft USA). They were reported as the mean \pm standard deviation. When comparing the two samples, the Fisher-Student t-test and Excel software at $p \leq 0.05$ were used.

Results and discussion

After cryopreservation by vitrification, (86.1 \pm 6.7); (87.1 \pm 7.3); (89.6 \pm 7.5)% of spermatozoa in groups 1–3, respectively, and (97.6 \pm 7.5) in group 4, were found to be viable. The number of motile spermatozoa in the analyzed groups was (65.9 \pm 6.8), (42.5 \pm 6.7), (41.3 \pm 8.1) and (85.6 \pm 6.7)%, respectively (Fig. 1). A decrease in sper-

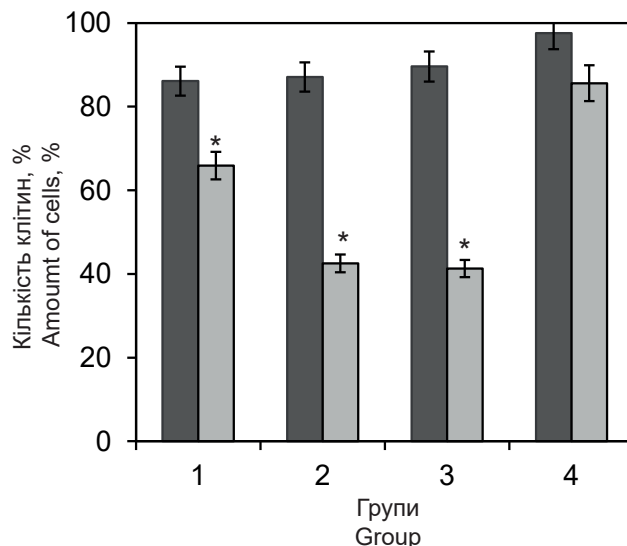


Рис. 1. Рухливість (■) і життєздатність (■) сперміїв людини після кріоконсервування. * – зміни статистично значущі порівняно з відповідним показником групи 4 ($p < 0,05$).

Fig. 1. Motility (■) and viability (■) of human spermatozoa after cryopreservation. * – changes were significant as compared to the corresponding index of group 4 ($p < 0.05$).

змогу визначити ступінь конденсації хроматину та структури перинуклеарної теки, постаक्रосомальний сегмент, центріоль, аксонему та периаксонемальну ділянку хвоста.

Встановлено, що в усіх досліджуваних групах кількість ультраструктурних аномалій була досить високою. Так, $(66,3 \pm 7,1)$, $(63,2 \pm 8,1)$, $(66,5 \pm 3,3)$ та $(60,7 \pm 7,5)\%$ сперматозоїдів мали аномалії голівки, шийки, хвоста або їхніх ультраструктурних елементів.

Більшу частину голівки спермійів всіх досліджуваних груп складав конденсований хроматин у вигляді електроннощільного однорідного матеріалу, з невеликими ділянками нижчої електронної щільності (рис. 2). У $(22,3 \pm 3,4)$, $(26,8 \pm 4,2)$, $(18,6 \pm 2,1)$ та $(16,6 \pm 1,4)\%$ спермійів груп 1–4 відповідно, спостерігали виникнення вакуолей у хроматині ядер спермійів. На передньому полюсі голівки візуалізувалася акросома, яка в нормі має вигляд плоскої цистерни, заповненої однорідною речовиною середньої електронної щільності та покриває приблизно

matozoa motility in groups 1–3 versus group 4 may be due to the fact that PVP and sucrose, composing the CM, are polymers, being characterized by an increased viscosity. The movement of spermatozoa in these media slows down until a complete immobilization, but they remain viable.

Morphological analysis of spermatozoa using light microscopy after cryopreservation revealed a slight increase in a part of motile spermatozoa with normal morphology as compared to the freshly isolated fraction, *i. e.* (35.6 ± 5.5) , (33.2 ± 4.7) , (36.6 ± 4.3) for groups 1–3, respectively, versus $(30.7 \pm 1.5)\%$ in group 4, that could be related to cryoselection.

For standard analysis of spermatozoa, we used the light microscopy, which enabled determining their morphological features, *i. e.* a number of spermatozoa heads and tails, their size and relative location, the presence and size of acrosome. The ultrastructural study allows investigating the degree of chromatin condensation and

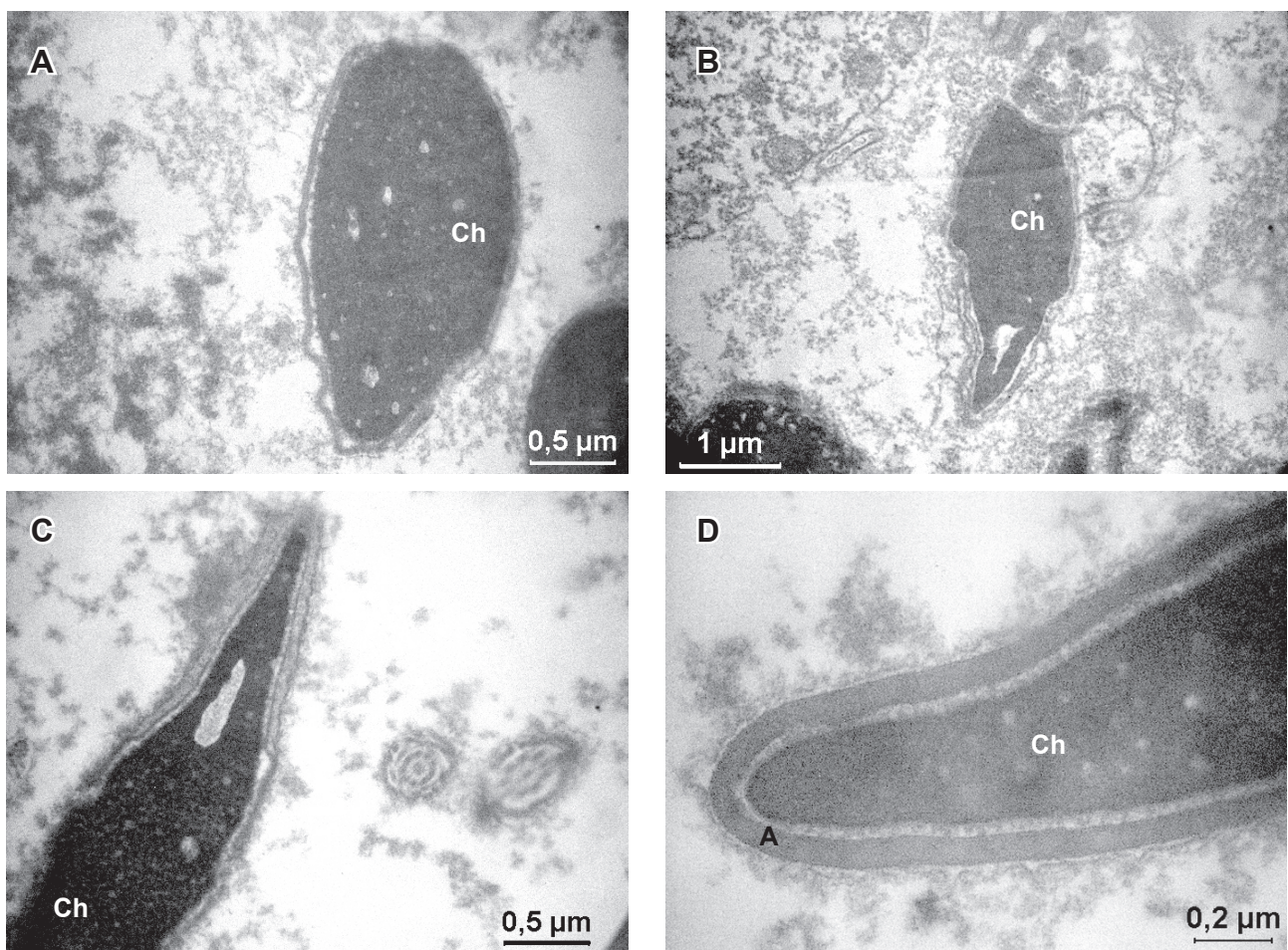


Рис. 2. Ультраструктура голівки сперматозоїда з конденсованим хроматином ядра і акросомою: **A** – група 1, **B** – група 2, **C** – група 3, **D** – група 4. Ch – хроматин; A – акросома.

Fig. 2. Ultrastructure of spermatozoa head with condensed nuclear chromatin and acrosome: **A** – group 1, **B** – group 2, **C** – group 3, **D** – group 4. Ch – chromatin; A is acrosome.



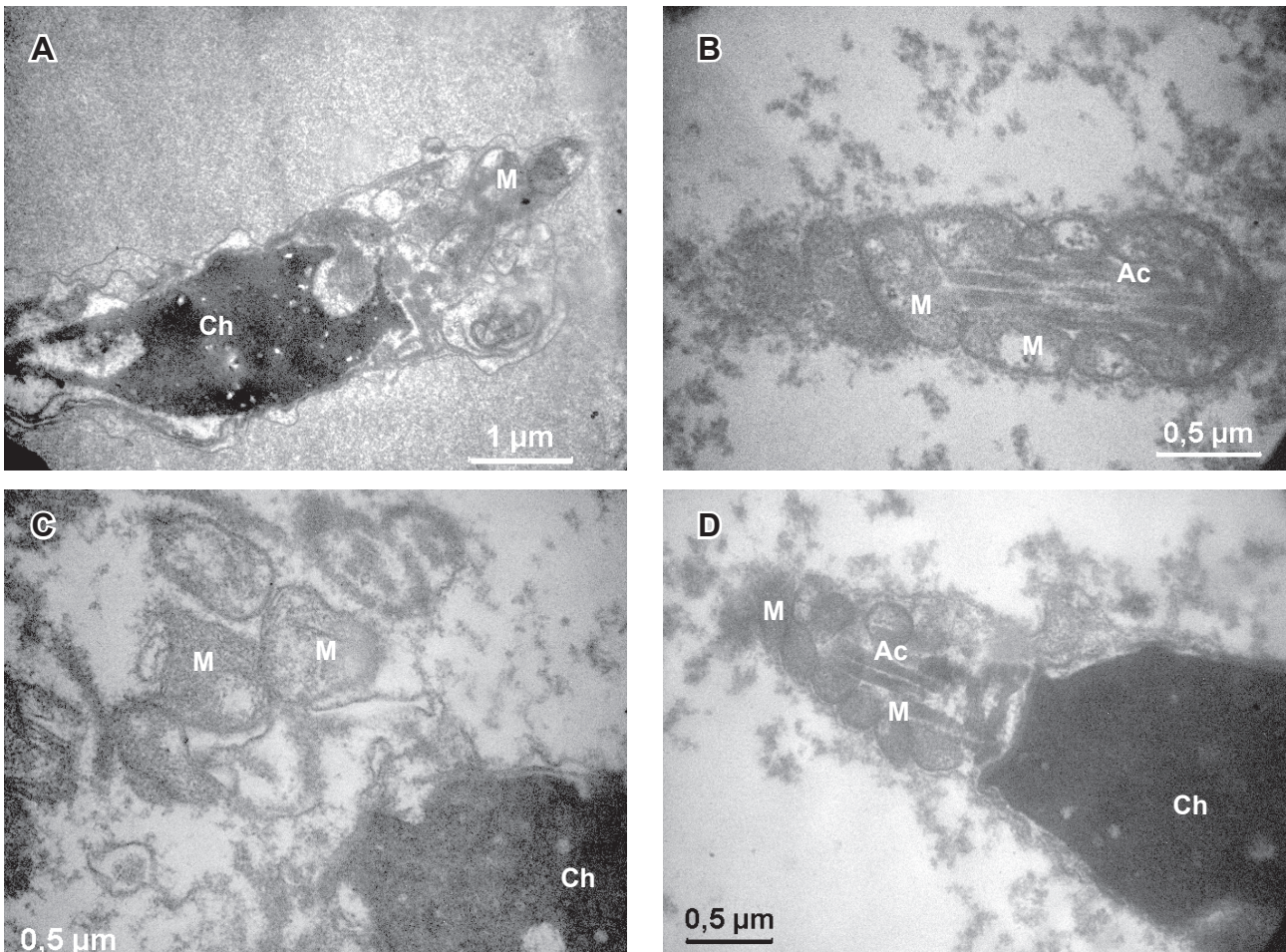


Рис. 3. Продольні зрізи шийок сперматозоїдів: **A** – група 1, **B** – група 2, **C** – група 3, **D** – група 4. М – мітохондрії; Ch – хроматин ядра; Ac – аксонема.
Fig. 3. Longitudinal sections of sperm necks: **A** – group 1, **B** – group 2, **C** – group 3, **D** – group 4. M is mitochondria; Ch – nuclear chromatin; Ac – axonema.

2/3 передньої поверхні ядра голівки [7]. У групах 1–3 ультраструктурні характеристики акросоми суттєво не відрізнялися від групи 4 (рис. 2).

Шийка сперматозоїда містила пару центріолей, які знаходилися під прямим кутом одна до одної. Варто зазначити факт збільшення у 1,5–2 рази розмірів мітохондрій сперміїв груп 1–3 порівняно з групою 4 (рис. 3).

Ультраструктурний аналіз джгутиків сперміїв досліджуваних груп виявив такі множинні гетерогенні перебудови аксонем та періаксонемальних структур, як зміни форми зовнішніх щільних фібрил або архітектури фіброзного шару (рис. 4, А, В), кількості та розташування дуплетів мікротрубочок (рис. 4, С). Проте аналогічні показники виявлено у сперміях усіх досліджуваних груп, можливо через те, що матеріалом дослідження були спермії з еякулятів при астенозооспермії (рис. 4).

Деякими авторами було встановлено зв'язок рухливості сперматозоїдів з їх подальшими ультраструктурними порушеннями: наявність

the structure of perinuclear theca, postacrosomal segment, centriole, axonema, and periaxonemal compartment of tail.

In all the experimental groups, the number of ultrastructural abnormalities was found to be quite a high. Thus, (66.3 ± 7.1) , (63.2 ± 8.1) , (66.5 ± 3.3) , and $(60.7 \pm 7.5)\%$ of spermatozoa had abnormalities of head, neck, and tail or their ultrastructural elements.

In all the studied groups the spermatozoa head was mostly consisted of a condensed chromatin as electron-dense homogeneous material, with small areas of lower electron density (Fig. 2). The appearance of vacuoles in nuclear chromatin of spermatozoa was observed in (22.3 ± 3.4) , (26.8 ± 4.2) , (18.6 ± 2.1) , and $(16.6 \pm 1.4)\%$ of spermatozoa of groups 1–4, respectively. The acrosome, which normally appearing as a flat cistern, filled with a homogeneous substance of average electron density and covered about 2/3 of anterior surface of head nucleus, was visualized at an anterior sperm head pole [1]. In groups 1–3, the ultrastruc-

цитоплазматичної краплі на голівці та шийці; нерегулярне укладання мітохондрій; відсутність центральної пари мікротрубочок аксономи джгутика; порушення будови пар периферичних мікротрубочок і дисплазія фіброзного шару джгутика [5, 8]. Існує думка, що кріоконсервування може викликати структурні порушення плазмалеми, акросоми та хвоста, які в подальшому зни-

tural characteristics of acrosome did not significantly differ from the group 4 (Fig. 2).

The spermatozoa neck contained two centrioles, placed at right angle to each other. The size of spermatozoa mitochondria was noted to increase in 1.5–2 times in groups 1–3 versus group 4 (Fig. 3).

Ultrastructural analysis of sperm flagella in the studied groups revealed multiple heterogeneous

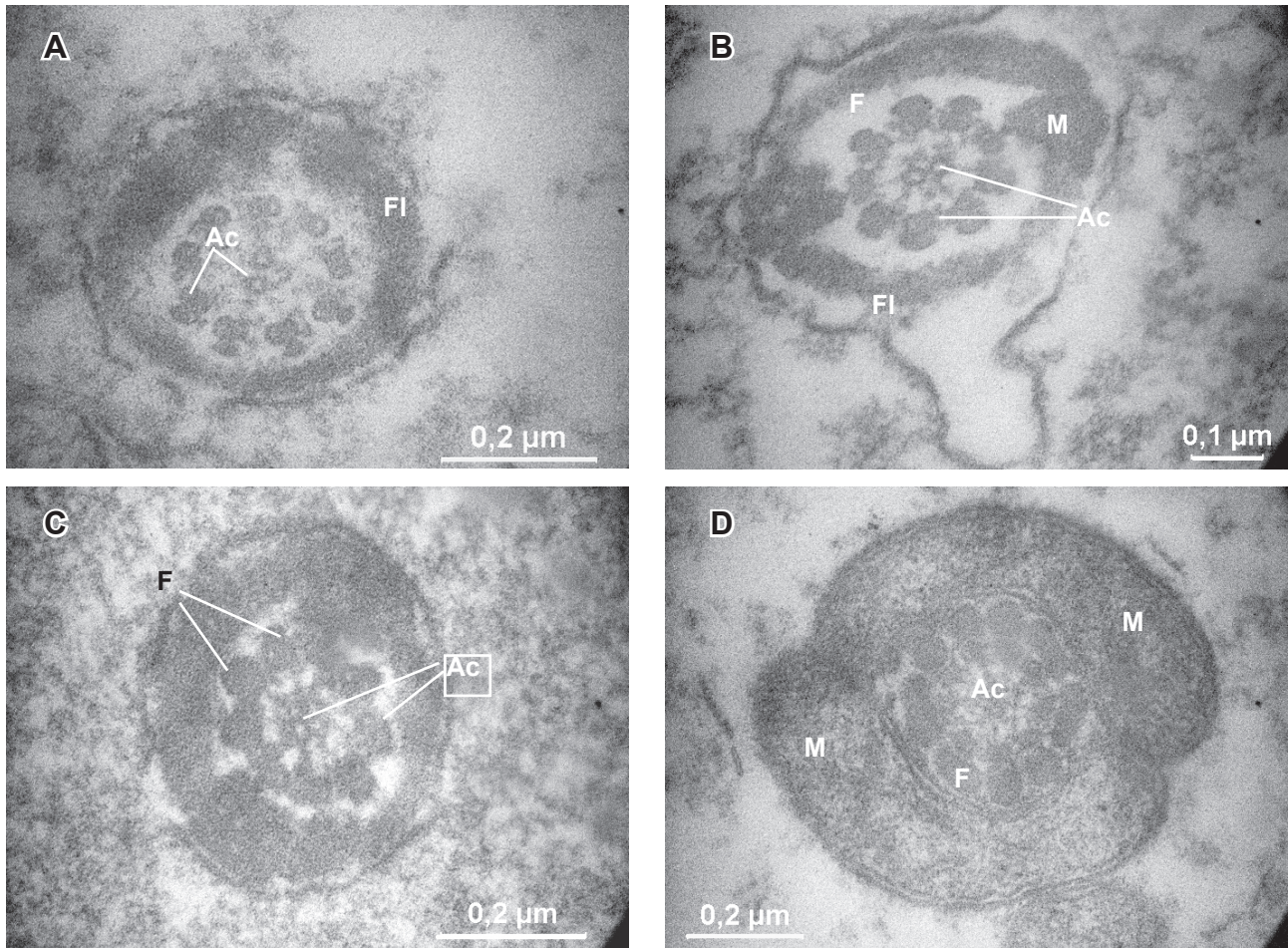


Рис. 4. Поперечні зрізи джгутиків сперматозоїдів: **A** – група 1, **B** – група 2, **C** – група 3, **D** – група 4. Ac – мікротрубочки аксономи; M – мітохондрії; F – зовнішні фібрили; FI – фіброзний шар.

Fig. 4. Cross sections of spermatozoa flagella: **A** – group 1, **B** – group 2, **C** – group 3, **D** – group 4. Ac – axoneme microtubules; M – mitochondria; F – external fibrils; FI is a fibrous layer.

жують рухливість сперміїв [18]. Оскільки в нашій роботі в якості кріопротекторів були застосовані речовини, які самі по собі знерухомлюють спермії, то ми не можемо стверджувати про вплив ультраструктурних змін на їх рухливість. Проте ми звернули увагу на наявність зазначених структурних відхилень у всіх досліджуваних групах.

За даними електронної мікроскопії встановлено, що хроматин сперміїв усіх досліджуваних груп був щільно конденсований, однак у групах 1–3 спостерігалася тенденція до збіль-

rearrangements of axoneme and periaxonemal structures, such as changes in a shape of outer dense fibrils or architecture of fibrous layer (Fig. 4A, B), number and location of microtubule doublets (Fig. 4). However, the same picture was found in the spermatozoa of all the studied groups, possibly due to the asthenozoospermic sperm samples, served the research material (Fig. 4).

Some authors have discovered the relationship between the spermatozoa motility and their subsequent ultrastructural disorders, *i. e.* the presence of cytoplasmic drop on head and neck; irregular



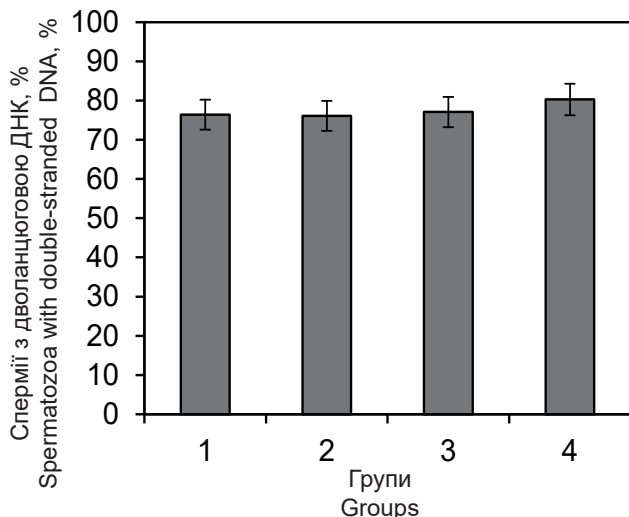


Рис. 5. Кількість спермій із неушкодженою ДНК після кріоконсервування.

Fig. 5. Spermatozoa number with intact DNA after cryopreservation.

шення кількості спермій зі зміненою структурою ДНК: у групі 4 – кількість спермій із неушкодженою ДНК склала $(80,3 \pm 3) \%$ (рис. 5). Незначне підвищення фрагментації ДНК у кріоконсервованих сперміях може бути пов'язано із окисно-відновними процесами, які виникають у сперматозоїдах під час кріоконсервування [19].

Аномальна упаковка хроматину та наявність одно- та двоцанцюгових розривів ДНК у сперміях можуть бути предикторами запліднення ооцитів [3] і подальшої якості ембріонів [22]. Оскільки в нормі ДНК повинна мати певну конформацію, хімічну і фізичну структуру, тому будь-яке незначне пошкодження вторинної або третинної структури ДНК може призвести до неправильного розвитку подій після проникнення такого дефектного сперматозоїда в яйцеклітину.

Таким чином, встановлено, що кріоконсервування сперматозоїдів людини методом вітрифікації з використанням розчинів сахарози та ПВП дозволяє зберегти морфофункціональну та ультраструктурну цілісність гамет. Цей метод є перспективним при лікуванні безпліддя з використанням у ДРТ, оскільки не потребує використання коштовного обладнання, не вимагає видалення кріопротектора та є простим і зручним.

Висновки

Використання непроникаючих кріопротекторів для кріоконсервування сперматозоїдів людини методом вітрифікації дозволяє зберегти їх морфофункціональну та ультраструктурну цілісність. За результатами електронної мікро-

laying of mitochondria; absence of central pair of microtubules of flagellar axoneme; altered structure of pair of peripheral microtubules and dysplasia of flagellar fibrous layer [12, 4]. It is thought that the cryopreservation may cause structural abnormalities of plasmalemma, acrosome and tail, which further reduce the spermatozoa motility [15]. Since here we used as cryoprotectants these substances, immobilizing the spermatozoa themselves, we could not state about the effect of ultrastructural changes on their motility. However, we pointed out that the mentioned structural abnormalities were present in all the groups under study.

Electron microscopy revealed the spermatozoa chromatin in all the investigated groups to be tightly condensed, but in groups 1–3 there was a tendency to increase in spermatozoa number with altered DNA structure, *i. e.* in group 4 the number of spermatozoa with intact DNA was $(80.3 \pm 3)\%$ (Fig. 5). A slight increase in DNA fragmentation in cryopreserved spermatozoa may be associated with the redox processes, occurring in spermatozoa during cryopreservation [18].

Abnormal chromatin packaging and the presence of single- and double-stranded DNA breaks in spermatozoa may be predictors of oocyte fertilization [17] and subsequent quality of embryos [22]. Since DNA normally should have a certain conformation, chemical and physical structure, so any slight damage to DNA or its packaging may entail an incorrect development of events after penetration of such a defective spermatozoon into the egg.

Thus, the cryopreservation of human spermatozoa by vitrification using sucrose solutions and PVP was found to enable preserving morphofunctional and ultrastructural integrity of gametes. This method is promising to apply in ART during infertility treatment, since it is easy-to-use simple way, when no expensive equipment and cryoprotectant removal required.

Conclusions

The use of non-penetrating cryoprotectants for human spermatozoa cryopreservation by vitrification allows preserving their morphofunctional and ultrastructural integrity. The electron microscopy revealed the absence of ultrastructural changes in acrosome, axoneme, periaxonemal structures, and flagella. Vitrification of human spermatozoa with sucrose and PVP in different combinations causes no impact on DNA fragmentation frequency. The cryopreservation by vitrification using non-penetrating cryoprotectants is promising for ART, since male gametes for oocyte

скопії встановлено відсутність ультраструктурних змін акросоми, аксонем, періаксонемальних структур та джгутіка. Вітрифікація спермій людини з сахарозою і ПВП у різних комбінаціях не впливає на частоту фрагментації ДНК. Метод кріоконсервування шляхом вітрифікації з використанням непроникаючих кріопротекторів є перспективним для ДРТ, оскільки чоловічі гамети для запліднення ооцитів можна використовувати негайно після відігріву без етапу видалення кріозахисного середовища.

Робота виконана в рамках програми «Підтримка розвитку пріоритетних напрямів наукових досліджень» (Код програмної класифікації видатків та кредитування 6541230). У подальшому планується провести дослідження, спрямовані на вивчення стану ДНК та дисперсії хроматину у сперміях після кріоконсервування різними методами.

Література

1. Брагина ЕЕ, Абдумаликова РА. Руководство по сперматологии. Москва: Сорек-полиграфия, 2002. 93 с.
2. Петрушко МП. Сучасний стан проблеми кріоконсервування репродуктивних клітин та ембріонів людини. Вісник НАН України. 2017; (7): 44–52. doi:10.15407/vsn2017.07.044.
3. Петрушко МП. Цитогенетический анализ неоплодотворенных ооцитов человека. Цитология и генетика. 2003; 37(7): 60–5.
4. Репин НВ, Марченко ЛН, Говоруха ТП, и др. Ультраструктура тканей перикарда и створок аортального клапана свиньи, девитализированных крио- и радиационным воздействием. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2015;25(3):246–54.
5. Хаят СШ, Брагина ЕЕ, Курило ЛФ. Ультраструктурное исследование сперматозоидов у пациентов с астенозооспермией. Андрология и генитальная хирургия. 2012;13(4):54–61.
6. Aizpurua J, Medrano L, Enciso M, et al. New permeable cryoprotectant-free vitrification method for native human sperm. Hum Reprod. 2017; 32(10):2007–15.
7. Afzelius B. Electron microscopy of the sperm tail results obtained with a new fixative. J Biophys Biochem Cytol. 1959; 5(2):269–78.
8. Chemes HE, Rawe VY. The making of abnormal spermatozoa: cellular and molecular mechanisms underlying pathological spermiogenesis. Cell Tissue Res. 2010;341(3):349–57.
9. Chohan KR, Griffin JT, Carrell DT. Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. Androl. 2004;36(5):321–6.
10. Conklin B, Richter E, Kreuziger K, et al. Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft. Med Eng Physics. 2002; 24(3):173–83.
11. Isachenko V, Isachenko E, Petrunkina AM, et al. Human spermatozoa vitrified in the absence of permeable cryoprotectants: birth of two healthy babies. J Reprod Fertil. 2012;24(2):323–26.
12. Isachenko V, Isachenko E, Katkov I, et al. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. Biol Reprod. 2004;71(4):1167–73.

fertilization may be used immediately after thawing without cryoprotective medium removal.

This research was carried out within the framework of the Program ‘Support for the Development of Priority Areas of Scientific Research’ (Program Classification Code of Expenditures and Crediting 6541230). To date, the study of DNA state and chromatin dispersion in spermatozoa after cryopreservation by different methods is planned.

References

1. Afzelius B. Electron microscopy of the sperm tail results obtained with a new fixative. J Biophys Biochem Cytol. 1959; 5(2): 269–78.
2. Aizpurua J, Medrano L, Enciso M, et al. New permeable cryoprotectant-free vitrification method for native human sperm. Hum Reprod. 2017; 32(10): 2007–15.
3. Bragina EE, Sorokina TM, Arifulin EA, Kurilo LF. [Genetically determined patozoospermia]. Moscow: SOREK–poligrafia. 2002. 93 p. Russian.
4. Chemes HE, Rawe VY. The making of abnormal spermatozoa: cellular and molecular mechanisms underlying pathological spermiogenesis. Cell Tissue Res. 2010; 341(3): 349–57.
5. Chohan KR, Griffin JT, Carrell DT. Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. Androl. 2004; 36(5): 321–6.
6. Conklin B, Richter E, Kreuziger K, et al. Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft. Med Eng Physics. 2002; 24(3): 173–83.
7. Isachenko V, Isachenko E, Petrunkina AM, Sánchez R. Human spermatozoa vitrified in the absence of permeable cryoprotectants: birth of two healthy babies. Reprod Fertil. 2012; 24(2): 323–6.
8. Isachenko V, Isachenko E, Katkov I, et al. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. Biol Reprod. 2004; 71(4): 1167–73.
9. Isachenko V, Maettner R, Petrunkina AM, et al. Cryoprotectant free vitrification of human spermatozoa in large (to 0.5 mL) volume: novel technology. Clin Lab. 2011; 57(9–10): 643–50.
10. Isachenko EP, Mallmann G, Rahimi J, et al. Vitrification technique—new possibilities for male gamete low-temperature storage. In: Katkov II, editor. Current Frontiers in Cryobiology. InTech Open Access Books; 2012. p. 41–76. [Cited 01.03.2019] Available from: <https://www.intechopen.com/books/current-frontiers-in-cryobiology/vitrification-of-fish-and-dog-spermatozoa>.
11. Fahy GM, Levy DI, Ali SE. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. Cryobiology. 1987; 24(3): 196–213.
12. Khayat SSh, Bragina EE, Kurilo LF. [Ultrastructural investigation of human sperm from asthenozoospermic men]. J Andr Genit Surg. 2012; 13(4): 54–61. Russian.
13. Mohamed MSA. Slow cryopreservation is not superior to vitrification in human spermatozoa; an experimental controlled study. Int J Reprod Med. 2015; 13(10): 633–44.
14. Nawroth F, Isachenko V, Dessole S, et al. Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants. CryoLetters. 2002; 23(2): 93–102.



13. Isachenko V, Maettner R, Petrunkina AM, et al. Cryoprotectant free vitrification of human spermatozoa in large (to 0.5 mL) volume: novel technology. *Clin Lab*. 2011;57(9–10):643–50.
14. Isachenko EP, Mallmann G, Rahimi J, et al. Vitrification technique-new possibilities for male gamete low-temperature storage. In: Katkov II, editor. *Current frontiers in cryobiology*. InTech Open Access Books; 2012. p. 41–76. [Cited 01.03.2019] Available from: <https://www.intechopen.com/books/current-frontiers-in-cryobiology/vitrification-of-fish-and-dog-spermatozoa>.
15. Fahy GM, Levy DI, Ali SE. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. *Cryobiology*. 1987;24(3):196–213.
16. Mohamed MSA. Slow cryopreservation is not superior to vitrification in human spermatozoa; an experimental controlled study. *J Reprod Med*. 2015;13(10):633–44.
17. Nawroth F, Isachenko V, Dessole S, et al. Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants. *CryoLetters*. 2002;23(2):93–102.
18. Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, et al. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet*. 2008; 25(8): 403–11.
19. Petrushko MP, Pavlovich EV, Pinyayev VI, et al. Apoptosis and processes of DNA fragmentation in native and cryopreserved human sperm cells at normo- and pathospermia. *Tsitol Genet*. 2017;51(4): 278–81.
20. Virant-Klun I, Tomazevic T, Meden-Vrtovec H. Sperm single-stranded DNA, detected by acridine orange staining, reduces fertilization and quality of icsi-derived embryos. *J Assist Reprod Genet*. 2002;19(7):319–28. doi: 10.1023/A:1016006509036.
21. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen fifth edition. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. 2010. 287 p.
22. Zheng WW, Song G, Wang QL, et al. Sperm DNA damage has a negative effect on early embryonic development following *in vitro* fertilization. *Asian J Androl*. 2018;20(1):75–9.
15. Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, et al. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet*. 2008; 25(8): 403–11.
16. Petrushko MP. [Current state of cryopreservation of reproductive cells and embryos]. *Visn Nac Akad. Nauk Ukr*. 2017; (7): 44–52. doi:10.15407/visn2017.07.044. Ukrainian.
17. Petrushko MP. The cytogenetic analysis of unfertilized human oocytes. *Tsitol Genet*. 2003, 37(6): 60–5.
18. Petrushko MP, Pavlovich EV, Pinyayev VI, et al. Apoptosis and processes of DNA fragmentation in native and cryopreserved human sperm cells at normo- and pathospermia. *Tsitol Genet*. 2017; 51(4): 278–81.
19. Repin NV, Marchenko LN, Govorukha TP, et al. Ultrastructure of porcine pericardium and aortic valve tissues, devitalized with cryogenic and irradiation exposures. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2015;25(3):246–54.
20. Virant-Klun I, Tomazevic T, Meden-Vrtovec H. Sperm single-stranded DNA, detected by acridine orange staining, reduces fertilization and quality of ICSI-derived embryos. *J Assist Reprod Genet*. 2002; 19(7): 319–28.
21. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, fifth edition. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. 2010. 287 p.
22. Zheng WW, Song G, Wang QL, et al. Sperm DNA damage has a negative effect on early embryonic development following *in vitro* fertilization. *Asian J Androl*. 2018; 20(1): 75–9.

