НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ГАПОН ГАННА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 612.616:57.086.13:[678.746.5+547.458.2

ДИСЕРТАЦІЯ

# СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПООДИНОКИХ СПЕРМІЇВ ЛЮДИНИ ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ

091 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії)

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело _____Г.О.Гапон

Науковий керівник Петрушко Марина Павлівна, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

Харків – 2021

# АНОТАЦІЯ

*Гапон Г.О.* Структурно-функціональний стан поодиноких сперміїв людини після кріоконсервування. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків – 2021.

Дисертаційна робота присвячена вирішенню проблеми ефективного кріоконсервування поодиноких сперматозоїдів людини при олігоастенотератозооспермії (ОАТ). У дисертаційній роботі теоретично обґрунтовано, методологічно визначено та статистично підтверджено вирішення актуального науково-практичного завдання кріобіології, а саме: наведено нові дані щодо впливу кріоконсервування з 10% розчином полівінілпіролідону (ПВП) у якості кріопротектору на ультраструктурні та морфофункціональні характеристики сперматозоїдів людини при ОАТ.

Після відтавання рухливими виявилися (78,8 ± 6,6)% сперматозоїдів, які були кріоконсервовані з 10% розчином гліцерину (група I) та (41,4 ± 8,1)% сперматозоїдів, кріоконсервованих з 10% розчином полівінілпіролідоном (ПВП) (група II). Свою життєздатність зберегли (92,1 ± 8,6)% та (89,6 ± 8,6)% сперматозоїдів груп I та II відповідно. Зразки групи I містили проникальний кріопротектор, який потребує видалення, тому ми повторно оцінювали рухливість клітин після подвійного центрифугування. Незважаючи на високу частоту виживання сперматозоїдів групи I, після центрифугування і видалення кріопротектору кількість рухливих сперматозоїдів зменшилася до (27,3 ± 4,8)%. Оскільки застосування непроникальних кріопротекторів не вимагає їх виведення, їх рухливість зберігалася на рівни нативних клітин (група III).

Морфологічний аналіз препаратів виявив, що частота аномалій голівки сперматозоїда склала 25,97 ± 2,67, 19,21 ± 2,67 та (20,57 ± 1,19)% для груп I–III відповідно. У групі I серед усіх можливих варіантів патології голівки більшу частину складали сперматозоїди з однією великою або декількома маленькими вакуолями. Частота аномалій шийки була незначною і склала 13,04 ± 0,98, 13,43 ± 2,14 та (13,26 ± 1,61)% для груп I–III відповідно. Різниця у кількості сперматозоїдів з патологією хвоста між групами була статистично незначуща (p>0,05). Сукупність дефектів голівки, шийки та середньої частини була значущо нижче у сперматозоїдах після кріоконсервування з ПВП (26,26 ± 2,61)%, порівняно з клітинами групи I – (35,73 ± 3,59)%. У нативних сперматозоїдах цей показник склав (24,88 ± 2,44)%.

Аналіз ультраструктурних аномалій з’ясував, що 83,2 ± 8,1, 63,2 ± 5,1 та (60,7 ± 7,5)% сперматозоїдів груп I-III мали аномалії голівки, шийки, хвоста або їхніх ультраструктурних елементів.

Не дивлячись на те, що за даними електронної мікроскопії хроматин сперматозоїдів усіх досліджуваних груп був щільно конденсований, у групах I–III спостерігалася тенденція до збільшення кількості сперматозоїдів із зміненою структурою ДНК (у групі III – кількість сперматозоїдів з неушкодженою ДНК склала (80,3 ± 3,0%)). Після кріоконсервування в групі I кількість сперматозоїдів із фрагментацією ДНК склала 38,8 ± 3,0, у групі II – (23,1 ± 2,5)%. Значуще підвищення фрагментації ДНК у кріоконсервованих сперматозоїдах може бути пов’язано із окислювально-відновними процесами, які виникають у сперматозоїдах під час кріоконсервування.

Встановлено, що після кріоконсервування сперматозоїдів досліджувальних груп кількість клітин з високим мембранним потенціалом становила 34,7 ± 4,2 та 54,5 ± 4,2 та (74,9 ± 3,8)% для груп I– III відповідно. Таким чином, після кріоконсервування сперматозоїдів з ПВП зберігається хоча і значущо більша кількість клітин з високим мембранним

потенціалом, ніж після кріоконсервування з гліцерином, але менша, ніж у контрольних зразках. Це можна пояснити негативним впливом кріоконсервування на функціональну активність клітин. Водночас необхідно зазначити, що ПВП виступає як кріопротектор, використання якого призводить до збереження значущо більшої кількості сперматозоїдів у чоловіків з ОАТ, ніж найбільш поширений метод заморожування з гліцерином.

Ми виявили істотні відмінності у здатності сперматозоїдів досліджуваних груп пенетретувати *Zona pellucida (ZP)*. Індекс і частота пенетрації *ZP* сперматозоїдами з нормозооспермічних еякулятів є значущо вищими, ніж при ОАТ. Фактори кріоконсервування не впливають на здатність сперматозоїдів зв'язуватися з *ZP* при нормозооспермії, однак призводять до її значущого зниження при ОАТ.

Морфокінетичний аналіз ембріонів виявив, що запліднення ооцитів сперматозоїдами, кріоконсервованими з 10% гліцерином призводить до зупинки розвитку на стадії 8-бластомерів більше 30% ембріонів. Такі ембріони характеризувались підвищеним рівнем фрагментації бластомерів, яка в окремих випадках сягала 100%. Частота блоку розвитку ембріонів на стадії 8-ми бластомерів, які були утворені після запліднення сперматозоїдами групи II, відповідала морфокінетичній картині групи III. Відповідно, частота формування бластоцист у групі I була значущо нижчою (30,9 ± 3,3), у порівнянні з даним показником для груп II (45,4 ± 4,1) та III (52,4 ± 5,2)% ($p<0,01$).

Таким чином, використання ПВП у якості кріопротектору дозволило отримати високу частоту збереження морфофункціональних та ультраструктурних характеристик поодиноких сперматозоїдів людини при ОАТ.

Вперше показано ефективність кріоконсервування поодиноких сперматозоїдів людини з ПВП, оскільки морфологічні та ультраструктурні характеристики, стан ДНК, рівень збереженності мітохондріального

потенціалу, запліднювальна здатність та розвитоку ембріонів *in vitro* відповідають таким при використанні свіжовиділених клітин .

Результати роботи можуть бути рекомендовані для використання в учбовому процесі в навчальних закладах для підготовки спеціалістів у різних галузях біології, зокрема кріобіології, ембріології, морфології, цитології та генетики.

**Ключові слова:** сперматозоїд, кріоконсервування, полівінілпіролідон, гліцерин, олігоастенотератозооспермія.

# СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ ТА ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових виданнях, у тому числі закордонних

1. Волкова НО, Павлович ОВ, **Гапон АА.** Стан деконденсації хроматину в сперміях людини після кріоконсервування та впливу електромагнітного випромінювання в мілімітровому діапазоні. Біофізичний вісник. 2013; 2:87–94.
2. Павлович ОВ, Ревенко ОБ, **Гапон ГО.** Оптимізація режиму відтавання кріоконсервованої сперми людини при нормо- та патоспермії. Проблемы криобиологии и криомедицины.2016; 26(1):45–52.
3. Павлович ЕВ, Петрушко МП, Юрчук ТА, Пиняев ВИ, **Гапон АА.** Тест на пенетрацию с *Zona pellucida* как предиктор оплодотворяющей способности нативных и криоконсервированных сперматозоидов человека. Український журнал медицини, біології та спорту. 2017;1:189–92.
4. Павлович ОВ, **Гапон ГО**, Юрчук ТО, Петрушко МП. Кріоконсервування сперматозоїдів людини з проникаючими і непроникаючими кріопротекторами. Медицина сьогодні і завтра. 2019; 4(85):27–34.
5. Петрушко МП, Павлович ОВ, Пуговкін АЮ, Коваленко ІФ, **Гапон ГО**, Піняєв ВІ, Юрчук ТО. Індукція вакуолізації в сперматозоїдах чоловіків з олгіастенотератозооспермією після кріоконсервування з гліцерином і полівнілпіролідоном. Морфологія. 2020;14(3):148–53.
6. Pavlovych O, **Hapon H**, Yurchuk T, Repin M, Marchenko L, Govorukha T, Petrushko M. Ultrastructural and Functional Characteristics of Human Spermatozoa After Cryopreservation by Vitrification. Probl Cryobiol Cryomed. 2020;30(1):24–33.

7. Yurchuk T, Petrushko M, **Gapon A**, Piniaiev V, Kuleshova L. The impact of cryopreservation on the morphology of spermatozoa in men with oligoasthenoteratozoospermia. Cryobiology. 2021 Mar 2:S0011-2240(21)00059-6. doi: 10.1016/j.cryobiol.2021.02.009. Epub ahead of print. PMID: 33667435.

Статті у рецензованих виданнях України

8. **Гапон ГО**, Павлович ОВ, Юрчук ТО, Піняєв ВІ, Петрушко МП. Кріоконсервування сперматозоїдів людини в ПВП і сахарози. Експериментальна і клінічна медицина. 2019;84(3):4–9.

Статті у збірниках наукових праць

9. Петрушко МП, Пиняев ВИ, Юрчук ТА, Павлович ЕВ, **Гапон АА.** Выбор тактики оплодотворения ооцитов человека криоконсервированными сперматозоидами в программе лечения бесплодия вспомогательными репродуктивными технологиями. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Урологія, андрологія, нефрологія». 2016. С.152–4.
10. Петрушко МП, Панасовский НЛ, Аркатов АВ, Павлович ЕВ, Юрчук ТА, Пиняев ВИ, **Гапон АА**. Эмбриологические параметры циклов лечения бесплодия методами ВРТ с использованием криоконсервированных эпидидимальных сперматозоидов. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Урологія, андрологія, нефрологія». 2017. С.106–8.
11. Петрушко МП, **Гапон ГО**, Юрчук ТО. Кріоконсервування сперматозоїдів людини при ОАТ. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Урологія, андрологія, нефрологія. Досягнення, проблеми, шляхи вирішення». Збірник наукових праць. Харків. 2019. С.147–8.

Патенти України на корисну модель

**12.** Патент України Патент № 144028. Україна, МПК A01N 1/02. Заявл.27.03.2020, з.н. u 2020 02082. Публ. 25.08.2020. Бюл. № 16. Петрушко МП, Юрчук ТО, **Гапон ГО**, Павлович ОВ. Спосіб кріоконсервування сперматозоїдів чоловіків з вадами сперматогенезу.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

13. Волкова НА, Павлович ЕВ, Николов ОТ, Петрушко МП, **Гапон АА**. Влияние факторов криоконсервирования на морфофункциональные характеристики спермы человека. Тезисы докладов научной конференции «Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины». Харьков, 18–19 октября 2012. Проблемы криобиологии. 2012;22(3):363.
14. Павлович ЕВ, Петрушко МП, Юрчук ТА, **Гапон АА**, Пиняев ВИ. Криоконсервирование единичных сперматозоидов путем витрификации в микросоломинках. Матеріали науково-практичної конференції з участю міжнародних спеціалістів, присвяченої дню науки «Медична наука на перетині спеціальностей: сьогодення і майбутнє» 19 травня 2017 р. С.84.
15. **Gapon GO,** Petrushko MP, Yurchuk TO, Pavlovich OV, Piniaev VI. Survival of Human Spermatozoa After Cryopreservation with No-Wash Procedure. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2018;28(2):171.
16. **Hapon HO,** Pavlovich OV, Yurchuk TO, Repin MV, Marchenko LM. Ultrastructural Characteristics of Human Sperm After Cryopreservation with Polyvinylpiralidon by Vitrification. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2019; 29(2):178.
17. **Гапон ГО,** Петрушко МП, Юрчук ТО. Кореляційний зв’язок стану ДНК та кінетичних характеристик сперматозоїдів людини під впливом факторів кріоконсервування методом вітрифікації.

Матеріали конференції «Актуальні питання сучасної медицини» 28-29 березня 2019р. С.67–68.

18. Петрушко МП, Павлович ОВ, Волкова НО, Пиняев ВИ, **Гапон АА**, Юрчук ТА. Апоптоз в нативных и криоконсервирвоанных сперматозоидах. Матеріали 5-го з'їзду клітинної біології з міжнародною участю. Одесса. 2-6 жовтня 2016. С. 12.
19. Павлович ОВ, Петрушко МП, Піняєв ВІ, **Гапон ГО**, Юрчук ТО. Morphological analysis of human spermatozoa at normozoospermia before and after cryopreservation. Матеріали Науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології», м. Дніпро 5-7 жовтня 2016 р. Присвяченої 100-річчю дніпропетровської (Катеринославської) школи морфологів. С.27–28.
20. **Гапон АА**, Юрчук ТА, Петрушко МП, Павлович ЕВ, Пиняев ВИ. Пенетрационная активность нативных и криоконсервированных сперматозоидов человека. Матеріали міжнародної конференції «Холод в біології та медицині», Х., 2017, С.38.
21. Petrushko MP, Yurchuk TA, **Gapon AA**, Pavlovich EV, Pinyaev VI. Micro- and large volumes cryopreservation of single human spermatozoa using non-penetrating cryoprotectant. Society for Low Temperature Biology Annual Meeting 2018 6-7 September 2018, Crop Research Institute (Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.), Czech Republic. CryoLetters. 2019;40(5):257–74.
22. **Гапон ГО**, Петрушко МП, Юрчук ТО, Піняєв ВІ, Павлович ОВ. Вибір оптимального кріозахисного середовища для заморожування сперматозоїдів людини. Науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 25-річчю НАМНУ. К., 23 березня Журнал Національної Академії Медичних Наук України. Спецвипуск. 2018 р. С.108–109.
23. **Гапон ГО**, Петрушко МП, Юрчук ТО, Павлович ОВ, Піняєв ВІ. Вплив сім'яної плазми на кінетичні характеристики та стан ДНК

кріоконсервованих сперматозоїдів людини. Матеріали XV Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» до 213-річчя зі дня заснування та 25-річчя зі дня відродження медичного факультету Харківського національного університету В.Н. Каразіна, 25-26 квітня 2018 року. С.61–63.

24. **Gapon G,** Yurchuk T, Pavlovich O, Petrushko M. DNA fragmentation of cryopreserved human sperm of men with pathospermia. Biopolimers and cell. 2019;35(5):399.
25. Pavlovich O, Piniaiev V, Yurchuk T. **Gapon G,** Petrushko M. Level of lipid peroxidation and antioxidant protection state in native and cryopreserved human spermatozoa. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу, м.Тернопіль, 30 вересня-4 жовтня 2019. С.122
26. **Гапон ГО,** Юрчук ТО, Петрушко МП. Оцінка морфологічних характеристик сперматозоїдів людини для вибору метода запліднення ооцитів у програмах ДРТ. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Актуальні проблеми морфології в теоретичній та практичній медицині». 24-25 жовтня 2019рю, м.Чернівці. С.44–6.
27. **Гапон ГО**, Павлович ОВ. Кріоконсервування сперматозоїдів людини з полівінілпіролідоном за олігоастенотератозооспермії. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2020;30(3):296.
28. **Гапон ГО**, Павлович ОВ, Юрчук ТО, Піняєв ВІ, Петрушко МП. Стан хроматину в сперматозоїдах людини після кріоконсервування. Матеріали четвертої всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» 4-6листопада 2020 р.; Дніпро. С.18.
29. **Гапон ГО**, Павлович ОВ, Юрчук ТО, Піняєв ВІ, Петрушко МП. Оцінка морфологічних параметрів сперматозоїдів, кріоконсервованих з ПВП. Матеріали XVII міжнародної науково-

практичної конференції «Актуальні питання сучасної медицини». Харків, 2020. С.72–3.

30. Petrushko MP, Pavlovich OV, Puhovkin AYu, Kovalenko IF, **Gapon GO**, Pinyaev VI, Yurchuk TO. Induction of vacuolizationin spermatozoa from men with oligoasthenoteratozoospermia after cryopreservation with glycerol and PVP матеріали четвертої всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародноюучастю «Теорія та практика сучасної морфології» 4-6листопада 2020 р; Дніпро, Україна с. 87–8.

## ANNOTATION

**Gapon G. A. Structural and functional state of single human sperm after cryopreservation. – The qualified scientific paper as a manuscript.**

Thesis for the degree of doctor of philosophy (Ph.D.) in specialty 091 Biology. – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2021.

The thesis is dedicated to the development of methods of cryopreservation of human sperm with oligoasthenoteratozoospermia (OAT). The current scientific and practical problem of cryobiology is theoretically substantiated, methodologically defined and statistically confirmed: new data are obtained on the effect of cryopreservation with 10 % solution of polyvinylpyrrolidone (PVP) (m. w. 360000) as a cryoprotectant on ultrastructural and morphofunctional characteristics of human sperm with OAT.

After warming, 78.8 ± 6.6 % of sperm cryopreserved with 10 % glycerol solution (group I) and 41.4 ± 8.1 % of sperm cryopreserved with 10 % PVP solution (group II) were motile. The viability of sperm after warming was 92.1 ± 8.6 % in group I and 89.6 ± 8.6 % in group II. The samples of group I contained a permeable cryoprotectant that needed to be removed, thus the cell motility was re-evaluated after double centrifugation. Despite the high sperm viability in group I, the share of motile sperm decreased to 27.3 ± 4.8 % after centrifugation

and removal of the cryoprotectant. The use of non-penetrating cryoprotectants does not require their removal, hence the sperm motility remained same as that of the native cells (group III).

The preparations were analyzed morphologically. The frequency of abnormalities of the sperm head was 25.97 ± 2.67, 19.21 ± 2.67 and (20.57 ± 1.19)% for groups I-III, respectively. In group I, the majority of variants of the sperm head pathologies were sperm with one large or several small vacuoles. The frequency of cervical abnormalities was insignificant and amounted to 13.04 ± 0.98, 13.43 ± 2.14 and (13.26 ± 1.61)% for groups I–III, respectively. The difference in the number of sperm with tail pathology was statistically insignificant. The sum of sperm defects was significantly lower in sperm after cryopreservation with PVP (26.26 ± 2.61) % compared with that in group I (35.73 ± 3.59) %. In native sperm, this figure was (24.88 ± 2.44)%.

Analysis of ultrastructural abnormalities revealed that 83.2 ± 8.1, 63.2 ± 5.1 and (60.7 ± 7.5)% of spermatozoa of groups I–III, respectively, had abnormalities of the head, mid piece, tail, or their ultrastructural elements.

According to electron microscopy, sperm chromatin of all studied groups was densely condensed. Despite that, the percentage of sperm with altered DNA structure tended to increase in groups I-III (in group III, the share of sperm with intact DNA was (80.3 ± 3.0) %). After cryopreservation, the share of sperm with DNA fragmentation was 38.8 ± 3.0 % in group I and (23.1 ± 2.5) % in group II. A significant increase in DNA fragmentation in cryopreserved sperm may be associated with redox processes that occur in sperm during cryopreservation.

After cryopreservation, the number of sperm cells with high membrane potential was 34.7 ± 4.2, 54.5 ± 4.2, and (74.9 ± 3.8) % for groups I – III, respectively. Thus, there are significantly more cells with high membrane potential after cryopreservation of sperm with PVP than after cryopreservation with glycerol, but less than in control samples. That can be explained by the negative impact of cryopreservation on the functional activity of cells. At the same time, it should be noted that PVP acts as a cryoprotectant, the use of which

leads to the preservation of significantly more sperm in men with OAT than the most common method of freezing with glycerol.

We found significant differences in the ability of sperm of the studied groups to penetrate *Zona pellucida* (*ZP*). The index and frequency of *ZP* penetration by sperm from normozoospermic ejaculates are significantly higher than in OAT. Cryopreservation factors do not affect the ability of normozoospermic sperm to bind to *ZP*, but lead to a significant reduction in the case of OAT.

Morphokinetic analysis of embryos revealed that fertilization of oocytes with sperm cryopreserved with 10 % glycerol leads to the arrest of development of more than 30% of embryos at the 8 blastomeres stage. Such embryos were characterized by an increased level of blastomere fragmentation, which in some cases reached 100 %. The arrest rate of the 8 blastomeres stage embryos, which were formed after fertilization with sperm of group II, corresponded to the morphokinetics of group III. Accordingly, the blastocyst formation rate in group I was significantly lower (30.9 ± 3.3 %) compared with this parameter for group II (45.4 ± 4.1 %) and III (52.4 ± 5.2%) ($p < 0.01$).

Thus, the use of PVP as a cryoprotectant allowed to achieve a high level of preservation of morphological, functional and ultrastructural characteristics of single sperm of men with OAT.

The effectiveness of using PVP in cryopreservation of single sperm of men with OAT was shown for the first time based on the morphological and ultrastructural characteristics, DNA status, mitochondrial potential, fertilization and *in vitro* embryo development.

The results of the presented study can be recommended for use in the teaching process in educational institutions for the training of specialists in various fields of biology, including cryobiology, embryology, morphology, cytology and genetics.

**Key words:** cryopreservation, sperm, polyvinylpyrrolidone, glycerol, oligoasthenoteratozoospermia.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ 16
ВСТУП 17
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 24
1.1 Сучасний стан проблеми кріоконсервування сперматозоїдів людини при вадах сперматогенезу 24
1.2 Роль морфофункціональних та ультраструктурних характеристик чоловічих гамет у їх кріорезистентності 33
1.3 Роль батьківського геному у раньому ембріогенезі 38
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 42
2.1 Загальні положення 42
2.2 Етичні аспекти досліджень 42
2.3 Схема експериментів 43
2.4 Аналіз еякуляту 44
2.5 Виділення активнорухливої фракції сперматозоїдів з еякуляту 44
2.6 Визначення рухливості та концентрації сперматозоїдів за допомогою системи CASA 45
2.7 Оцінка морфологічних характеристик сперматозоїдів після забарвлення еозином-нігрозіном 47
2.8 Кріоконсервування сперматозоїдів 50
2.8.1 Кріоконсервування сперматозоїдів двоетапним методом 50
2.8.2 Відтавання сперматозоїдів 50
2.9 Прижиттєве визначення цілісності цитоплазматичної мембрани сперматозоїдів 51
2.10 Електронна мікроскопія ультраструктурних характеристик сперматозоїдів 51
2.11 Оцінка функціональної активності мітохондрій сперматозоїдів людини методом проточної цитофлуориметрії 52

2.12 Тест на пенетрацію з *Zona pellucida* 54
2.13 Запліднення ооцитів методом ICSI 55
2.14 Культивування *in vitro* та оцінка морфокінетичних характеристик ембріонів 56
2.14.1 Оцінка ембріонів 2–3 доби розвитку *in vitro* 56
2.14.2 Оцінка ембріона 5-ї доби розвитку *in vitro* 57
2.15 Використані реактиви 57
2.16 Програмне забезпечення 58
2.17 Статистична обробка даних 58
РОЗДІЛ 3 ВПЛИВ РІЗНИХ СПОСОБІВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ТА РУХЛИВІСТЬ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ПРИ ОЛІГОАСТЕНОТЕРАТОЗООСПЕРМІЇ 60
РОЗДІЛ 4 МОРФОЛОГІЧНІ ТА УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ЛЮДИНИ, КРІОКОНСЕРВОВАНИХ МЕТОДОМ ДВОЕТАПНОГО ОХОЛОДЖЕННЯ З ПВП 70
РОЗДІЛ 5 РІВЕНЬ ФРАГМЕНТАЦІЇ ДНК ТА ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ МІТОХОНДРІЙ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ЛЮДИНИ ПЕРЕД ТА ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ 79
РОЗДІЛ 6 КЛІНІЧНІ ТА ЕМБРІОЛОГІЧНІ ПАРАМЕТРИ ЦИКЛІВ ЛІКУВАННЯ БЕЗПЛІДДЯ МЕТОДОМ ICSI З ВИКОРИСТАННЯМ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ СПЕРМАТОЗОЇДІВ 84
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ 90
ВИСНОВКИ 106
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 107
ДОДАТОК А 135
ДОДАТОК Б 141

# ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

| | |
|---|---|
| DIC | диференційно-інтерференційний контраст |
| ESHRE | Європейська спільнота репродукції людини та ембріології |
| ICSI | інтрацитоплазматична ін’єкція сперматозоїда в ооцит |
| HSA | human serum albumin – сироротковий альбумін людини |
| *in vitro* | поза живим організмом |
| IVF | *in vitro* fertilization – запліднення *in vitro* |
| Mr | молекулярна маса |
| ZP | Z*ona pellucida* – вітелінова оболонка |
| ДРТ | допоміжні репродуктивні технології |
| ДМСО | диметилсульфоксид |
| ДНК | дезоксирибонуклеїнова кислота |
| ЕГ | Етиленгліколь |
| ЕТ | Ембріотрансферу |
| ЕКЗ | екстракорпоральне запліднення |
| КП | кріопротектор |
| КС | кріозахисне середовище |
| МО | міжнародна одиниця |
| мкл | мікролітр |
| ММП | мембранний мітохондріальний потенціал |
| ОАТ | олігоастенотератозооспермія |
| ОКК–комплекс | ооцит–корона–кумулюсний комплекс |
| ПВП | полівінілпірролідон |
| РА | рідкий азот |
| РНК | рібонуклеїнова кислота |
| ПД | пропандіол |

# ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження.**

Важливим елементом допоміжних репродуктивних технологій, які застосовуються при лікуванні важких форм чоловічого безпліддя, є низькотемпературне консервування [1]. На даний час забезпечити його може тільки глибоке заморожування біооб'єктів до температури рідкого азоту [2]. Метод кріоконсервування сперматозоїдів набуває особливої актуальності для збереження фертильності перед променевою або хіміотерапією та операційними заходами [3]. Цей метод дозволяє зберегти фертильність пацієнтів, які з тих чи інших причин піддаються впливу потенційно токсичних агентів, які порушують гаметогенез [4].

Протягом достатньо великого часу багато дослідників приділяли увагу вітрифікації ооцитів та ембріонів [5]. Перше повідомлення про успішну вітрифікацію сперматозоїдів людини було описано В. Ісаченко зі співавт. [6]. Незважаючи на декларування того, що вони вітрифікують сперматозоїди без кріопротекторів, насправді, автори використовували непроникальний кріопротектор – сахарозу [7].

У даний час розроблені ефективні методи повільного заморожування сперматозоїдів людини при нормозооспермії, які дозволяють зберігати життєздатність гамет на рівні 70% [8]. Незважаючи на успішне заморожування сперматозоїдів ручними методами, відтворюваність цієї процедури може мати деякі проблеми. Деякі автори стверджують, що звичайне повільне заморожування, як ручне, так і автоматизоване, спричинює значні хіміко-фізичні пошкодження сперми [9].

Наявність у кріозахисному розчині проникального кріопротектору, зумовлює необхідність його видалення після відтавання, що різко знижує кількість життєздатних сперматозоїдів. Етап видалення кріопротектору передбачає, як мінімум, дворазове центрифугування зразка, яке

негативним чином впливає на морфофункціональні характеристики сперматозоїдів. Тому пошук альтернативних методів кріоконсервування, що базуються на використанні кріопротекторів, які не потрібно видаляти, є актуальним. ПВП (м. м. 360 000) у концентрації 10% широко використовується у програмах допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) з метою імобілізації сперматозоїдів для запліднення методом інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда в ооцит (ICSI). Крім того, ПВП є полімером з виразними кріозахисними функціями.

Саме це обумовлює вибір теми дисертаційного дослідження – припущення використовувати для кріоконсервування сперматозоїдів ПВП у якості кріопротектору, який не потребує видалення з кріозахисного середовища після відтавання та дозволяє одразу використовувати сперматозоїди для ICSI. Для безпечного використання ПВП у якості кріопротектору актуальним є визначення морфофункціональних та ультраструктурних характеристик чоловічих статевих клітин після кріоконсервування.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами,**

Дисертаційна робота виконана відповідно до плану НДР Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України і тем відділу кріобіології систем репродукції № 2.2.6.58 «Вивчення змін репродуктивної функції тварин і людини під впливом кріоконсервованих клітинних препаратів та фізико-хімічних факторів» (номер держреєстрації – 0111U001197), № 2.2.6.108 «Вивчення впливу факторів кріоконсервування при вітрифікації на морфофункціональні характеристики репродуктивних клітин та ембріонів» (номер держреєстрації – 0116U003498) та № 2.2.6.128 «Обґрунтування диференційованого підходу до кріоконсервування репродуктивних клітин з урахуванням їх вихідного стану та видоспецифічності» (номер держреєстрації – 0120U100546), в яких автор самостійно виконувала окремі розділи, отримані результати були включені до звіту відділу.

**Мета і завдання дослідження.**

Мета роботи – визначення ультраструктурних та морфофункціональних характеристик поодиноких сперматозоїдів людини при олігоастенотератозооспермії після кріоконсервування.

Для досягнення поставленої мети розв'язано такі наукові завдання:

1. Підібрати оптимальний режим кріоконсервування поодиноких сперматозоїдів людини при ОАТ.

2. Оцінити рухливість, життєздатність, морфологічні та ультраструктурні характеристики чоловічих статевих клітин перед та після кріоконсервування методом двоетапного охолодження з використанням різних кріопротекторів – 10% гліцерином та 10% ПВП.

3. Визначити рівень фрагментації ДНК та оцінити мітохондріальний мембранний потенціал сперматозоїдів перед та після їх кріоконсервування з проникним та непроникним кріопротектором.

4. Визначити вплив методів кріоконсервування сперматозоїдів на подальшу частоту запліднення ооцитів та морфокінетичні параметри ембріонів *in vitro*.

**Об'єкт дослідження** – зміни морфофункціональних та ультраструктурних характеристик сперматозоїдів чоловіків з ОАТ після кріоконсервування з високомолекулярним розчином ПВП.

**Предмет дослідження** – збереженість, морфологічні та функціональні характеристики кріоконсервованих з 10% розчином ПВП сперматозоїдів людини.

**Методи дослідження.** Під час виконання роботи використовували такі методи: світлову мікроскопію для визначення морфологічних характеристик сперматозоїдів людини; електронну мікроскопію для оцінки будови їх ультраструктурних елементів. Для вивчення функціональних характеристик сперматозоїдів перед та після кріоконсервуванням оцінювали їх рухливість за допомогою комп'ютерного аналізу CASA; використовували SCD-тест для визначення рівня фрагментації ДНК;

проточну цитофлуоріметрію з використанням забарвлення потенціалзалежним зондом JC-1 для визначення кількості сперматозоїдів з високим мітохондріальним потенціалом; кріобіологічні та статистичні методи дослідження.

**Наукова новизна отриманих результатів**.

У роботі вперше було розроблено метод кріоконсервування сперматозоїдів чоловіків з вадами сперматогенезу з 10% ПВП (м. м. 360000) у якості кріопротектору. Показано, що показники рухливості, життєздатності та запліднювальної здатність сперматозоїдів, кріоконсервованих з ПВП, значуще не відрізняються від таких для нативних клітин. Уперше проаналізовані морфологічні та ультраструктурні характеристики сперматозоїдів після кріоконсервування з ПВП. Визначено частоту фрагментації ДНК, кількість клітин з високим мітохондріальним потенціалом у сперматозоїдах, кріоконсервованих з ПВП. Вивчено показники запліднення ооцитів сперматозоїдами, кріоконсервованими з ПВП та здійснено морфокінетичний аналіз розвитку ембріонів *in vitro*.

**Практичне значення отриманих результатів.**

Результати роботи дозволяють розширити уявлення про кріорезистентність сперматозоїдів людини.

У роботі розроблено спосіб кріоконсервування сперматозоїдів чоловіків з вадами сперматогенезу з 10% ПВП в якості кріопротектору. Запропонований метод дозволяє використовувати сперматозоїді для запліднення ооцитів без видалення кріопротектору. Оцінка шийного відділу сперматозоїдів при світловій мікроскопії дозволяє відбирати для запліднення сперматозоїди з високим мітохондріальним потенціалом, що підвищує частоту запліднення ооцитів та морфокінетичні характеристики ембріонів *in vitro*.

**Особистий внесок здобувача.**

Дисертаційна робота є самостійним та оригінальним науковим дослідженням, основні результати якого були отримані особисто здобувачем. Автором проведено патентно-інформаційний пошук, спільно із керівником визначені мета та завдання роботи, а також шляхи їх вирішення. Здобувачем особисто одержано експериментальні дані усіх розділів дисертаційної роботи, проведені їх первинний аналіз та статистична обробка. Спільно з науковим керівником здійснено інтерпретацію результатів і сформульовано остаточні висновки. Співавтори публікацій: Павлович О.В, Петрушко М.П., Піняєв В.І., Подуфалий В.В., Юрчук Т.О. надали консультативну підтримку або допомогу у виконанні окремих методичних завдань.

В опублікованих зі співавторами роботах [10-39] особистий внесок здобувача полягає:

у роботах [11, 12, 14, 16, 20-24, 30-32, 36] – дисертантом визначено частоту виживання сперматозоїдів після кріоконсервування різними методами; проведено їх статистичний аналіз; написані та оформлені матеріали статей та тез;

у роботах [15, 17, 25, 28, 35, 38, 39] – дисертантом виконано морфологічну оцінку сперматозоїдів; систематизовано первинну інформацію; підготовлено матеріали до друку;

у роботах [17, 25, 35, 38] – дисертантом виконано кріобіологічну постановку експериментів; проведено аналіз мікрофотографій; підготовлено матеріали до друку;

у роботах [13, 18, 19, 29] – дисертантом проведені експерименти з визначення рівеня фрагментації ДНК, оцінено ступінь зв’язування з чоловічих статевих клітин з *ZP* та проаналізовано дані щодо запліднювальної здатності сперматозоїдів; прийнято участь в обговоренні отриманих результатів.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертаційної роботи були представлені на наступних наукових конференціях та форумах: Присвяченій 100-річчю дніпропетровської (катеринославської) школи морфологів (Дніпро, 2016 р.); Науково-практичній конференції молодих вчених, присвяченій 25-річчю НАМНУ (Київ, 2016 рік); 5-му з'їзду клітинної біології з міжнародною участю (Одеса, 2016); науково-практичних конференціях з міжнародною участю «Урологія, андрологія, нефрологія» (2016–2019 рр); XIV – XVII міжнародній науковій конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 2017–2020 рр.); 41-й – 44-й щорічних конференціях молодих вчених «Холод в біології і медицині» (Харків, 2017–2020 рр.); Науково-практичній конференції за участю міжнародних спеціалістів, присвяченій дню науки «Медична наука на перетині спеціальностей: сьогодення і майбутнє» 19 травня 2017 р. (м. Харків); щорічній конференції Society for Low Temperature Biology Annual Meeting 2018, Czech Republic; Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології», XII Українському біохімічному конгресі (м. Тернопіль, 2019 рік); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми морфології в теоретичній та практичній медицині» (Чернівці, 2019); четвертій всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» (4-6 листопада 2020 р; Дніпро, Україна).

**Публікації матеріалів.** За результатами дисертації опубліковано 30 наукових робіт, з яких 11 статей: 2 – закордонні, які включено до міжнародної наукометричної бази Scopus, 5 – у наукових фахових виданнях України (з них 2 включено до міжнародної наукометричної бази Scopus), 1 – в рецензованих виданнях України, 3 – опубліковано у збірнику наукових праць; 1 патент України на корисну модель та 18 тез доповідей у матеріалах міжнародних та національних конгресів і конференцій.

**Об’єм і структура дисертації.** Матеріали викладені на 141 сторінці друкованого тексту, в тому числі 23 сторінки – цитованої літератури. Робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів, результатів власних досліджень, їх узагальнення та обговорення, висновків, списку цитованої літератури, який складається з 223 джерел, з них 85 вітчизняних, 138 зарубіжних. Робота ілюстрована 26 рисунками та 6 таблицями.

# РОЗДІЛ 1 МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ТА УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ЛЮДИНИ ПРИ ОЛІГОАСТЕНОТЕРАТОЗООСПЕРМІЇ ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ З ПРОНИКАЛЬНИМИ ТА НЕПРОНИКАЛЬНИМИ КРІОПРОТЕКТОРАМИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

## 1.1 Сучасний стан проблеми кріоконсервування сперматозоїдів людини при вадах сперматогенезу

Проблема безпліддя у шлюбі має декілька аспектів: фізіологічний, до якого належать усі патологічні стани здоров’я пари, та соціальний – погіршення демографічного стану в країні. Протягом останніх років спостерігається невпинне зниження рівня фертильності чоловіків [4]. Було використано багато методик стимуляції сперматогенезу за допомогою фармакопейних препаратів, однак їх ефективність виявилася дуже низькою [40, 41]. Високоефективним методом подолання безпліддя подружніх пар з патологією сперматогенезу у чоловіків є ДРТ [1]. При цьому є велика потреба у зберіганні генетичного матеріалу партнерів для проходження етапів лікування [3]. На даний час забезпечити його може тільки глибоке заморожування біооб’єктів до температури рідкого азоту [2].

Охолодження живих клітин нижче 0°С супроводжується виморожуванням води в клітині, в результаті чого в ній істотно збільшується концентрація розчинених солей, змінюється pH, утворюється поза- і внутрішньоклітинні кристали льоду, виникають механічні напруги, які ушкоджують клітину [42]. Вищезазначені процеси порушують роботу клітинних структур, які забезпечують клітину енергією, підтримують її життєдіяльність і взаємодію з зовнішнім середовищем [43].

Необхідність підвищення рівня виживання чоловічих репродуктивних клітин після кріоконсервування призводить до розвитку декількох напрямів наукових досліджень.

Перший – розробка ефективних режимів кріоконсервування, другий – пошук нових ефективних кріозахисних середовищ, третій – створення зручних кріоконтейнерів. Вони є взаємопов’язаними, оскільки ефективність кріопротекторних середовищ безпосередньо залежить від режимів охолодження-відтавання, які застосовуються для кріоконсервування [44].

На сьогоднішній день існує три загальноприйнятих способи кріоконсервування: повільний, швидкий та вітрифікація.

Показано, що оптимальна початкова швидкість охолодження зразка від кімнатної температури до 5°C становить 0,5–1°C/хв. Потім клітини заморожують від 5°C до –80°C зі швидкістю 1–10°C/хв після чого занурюють у рідкий азот при –196°C [45]. Якщо швидкість охолодження занадто висока, всередині клітин можуть утворюватися кристали льоду. При повільній швидкості охолодження клітини можуть стискатися, внаслідок осмотичних явищ. Отже, заморожування має бути контрольованим за допомогою швидкості охолодження. Відсутність контролю над швидкістю охолодження можна подолати, використовуючи автоматизований програмний заморожувач. Основним недоліком автоматизованого заморожування є те, що питома теплота кристалоутворення виділяється із самих зразків, що значно змінює температуру камери і зменшує швидкість охолодження [46].

Швидке заморожування вперше запропонував Jerome K. Sherman, якому вдалося зберегти 60% життєздатних сперматозоїдів при використані 10% гліцерину при швидкості охолодження 25°C/хв до –75°C, а потім зі швидкістю 16°C/хв до –100$^0$C [47]. Ця техніка вимагає прямого контакту між соломинкою та парами азоту на 8–10 хв та занурення у рідкий азот при –196°C. Спочатку зразок змішують по краплях з рівним об’ємом кріопротектору; суміш завантажують у соломинку та залишають інкубувати за температури 4°C протягом 10 хв. Враховуючи те, що усередині парів азоту існує тепловий градієнт соломинку розміщують на

відстані 15–20 см вище рівня рідкого азоту (−80°C) на 15 хв; на закінчення цього етапу соломинку занурюють у рідкий азот. Під час охолодження соломку розміщують у горизонтальному положенні, щоб мінімізувати різницю тепла між двома кінцями. Ця техніка має деякі недоліки, серед яких, наприклад, низька відтворюваність результату.

Способи кріоконсервування із швидким охолодженням були розроблені науковцями ІПКіК НАН України під керівництвом академіка НАН України В.І. Грищенка. Вони модифікували методику Jerome K. Sherman холодовою адаптацією репродуктивних клітин при + 4°C протягом 45 хв перед додаванням кріопротектору. Цілісний еякулят заморожували у контейнерах об’ємом 0,25-1,0 мл зі швидкістю охолодження 10-30 °C/хв та швидкістю відігріву понад 500°C/хв [48].

У 1964 р. вперше народилося 4 немовлят після внутрішньоматкової інсемінації відігрітими сперматозоїдами. У 1982 р. вперше в Україні народилися діти після штучної інсемінації кріоконсервованою спермою донорів [49, 50].

Під час кріоконсервування сперматозоїдів людини ручним або автоматизованим повільним чи швидким методом необхідним є використання кріопротекторів. Проникальні кріопротектори, такі як гліцерин, ДМСО, етиленгліколь, формамід, 1,2-пропандіол, 2,3-бутандіол та пропіленгліколь, впливають на сперматозоїди під час кріоконсервування, змінюючи фізичні властивості внутрішньоклітинного розчину, зменшуючи внутрішньоклітинне утворення льоду, підвищуючи стійкість до холодового шоку, регулюючи білкову та ліпідну структуру клітинної мембрани та збільшують її плинність [51].

Гліцерин – проникальний кріопротектор, найбільш широко застосовуваний щодо кріоконсервування сперматозоїдів людини. Ця речовина впливає на структуру мембрани, проникність та стабільність ліпідного двошару, асоціацію поверхневих білків та клітинний метаболізм [52]. Використання гліцерину було головним проривом у кріобіології [53].

Проте пізніше було показано, що гліцерин у концентрації понад 1,5% полімеризує цитоскелет актину [54]. Використання 15% гліцерину негативно впливає на морфологічні характеристики сперматозоїдів та їх життєздатність [55]. Були запропоновані інші захисні речовини, наприклад, диметилсульфоксид (ДМСО). Проте було встановлено його шкідливий вплив на сперматозоїди людини при використанні за температур вище 4°C та було підтверджено, що шкідливий вплив ДМСО пов'язаний, перш за все, з його токсичністю [52].

Використання яєчного жовтка та альбуміну сироватки крові покращило результативність кріоконсервування, проте обидві добавки мають тваринне походження і тому потенційно можуть контамінувати зразки [56].

Деякі дослідники пропонували знизити концентрацію гліцерину до 3,5%, використовуючи середовище гліцерин-лактоза-жовток та 1мМ адреналіну [57]. Метод був не дуже зручний у роботі, оскільки гліцерин потрібно було видаляти, а, оскільки сперматозоїди були кріоконсервовані в мікрооб'ємах, зробити це було досить важко.

WB Schill зі співавт. з'ясували, що додавання у середовище 10% гліцерину призводить до зростання рівня акрозину у середовищі інкубації і цей рівень продовжує зростати під час низькотемпературного зберігання клітин [58].

Деякі автори стверджують, що звичайне повільне заморожування (ручне або автоматизоване) призводить до хіміко-фізичних пошкоджень сперматозоїдів, перш за все, через кристалізацію льоду [9].

У відділі кріобіології системи репродукції ІПКіК НАН України було розроблено метод кріоконсервування сперматозоїдів за умов понадшвидкого охолодження (3000–5000 °C/хв) під захистом багатокомпонентного кріозахисного середовища, до складу якого входив гліцерин. Після кріоконсервування зазначеним методом вдалося зберегти життєздатність клітин на рівні 80% [59, 60].

Недоліками повільного та швидкого методів кріоконсервування є необхідний етап центрифугування з метою видалення кріопротектору.

Сьогодні робляться спроби використовувати метод вітрифікації для кріоконсервування сперматозоїдів. Перевагами вітрифікації є швидкість виконання процедури. Протягом достатньо великого часу багато дослідників приділяли увагу вітрифікації ооцитів та ембріонів [5]. Було встановлено, що для досягнення стабільної вітрифікації та можливості використовувати відносно низьку швидкість охолодження та відігріву, при вітрифікації ооцитів та ембріонів треба використовувати великі концентрації як проникальних, так і непроникальних кріопротекторів. Однак у цього методу також є свої обмеження, оскільки сперматозоїди людини є чутливими до високих концентрацій кріопротекторів, які зазвичай використовуються для забезпечення склування розчину. Перше повідомлення про успішну вітрифікацію чоловічих гамет було описано В. Ісаченко зі співавт. [6]. Незважаючи на декларування того, що вони вітрифікують сперматозоїди без кріопротекторів, насправді, автори використовували непроникальний кріопротектор – сахарозу [7].

Використання проникальних кріопротекторів у середовищах кріоконсервування збільшує осмолярність, яка коливається від 600 до 1000 мОсм/л. На відміну від цього, середовище для вітрифікації є ізоосмолярним від 300 до 396 мОсм/л, що може бути досягнуто за допомогою непроникальних кріопротекторів [61]. Зазначені кріопротектори не можуть проникати крізь мембрану клітин і діють лише у позаклітинному середовищі. Вони зменшують точку замерзання середовища [62]. Зазвичай їх поділяють на дві групи: низькомолекулярні та високомолекулярні. Непроникальні кріопротектори з низькою молекулярною масою включають три підгрупи: моносахариди (глюкоза та галактоза), дисахариди (сахароза та трегалоза) та трисахариди (рафіноза). Кріопротектори з високою молекулярною масою (наприклад, поліетиленгліколь, фікол 70, поліетиленоксид, полівініловий спирт, ПВП

та ін.) виконують свої функції за рахунок зменшення кристалів льоду, які утворюються зовні під час вітрифікації для зменшення пошкодження клітин.

У цьому аспекті важливим є пошук кріопротекторів, які не потрібно виділяти після відтавання, для того, щоб обійти руйнівний вплив центрифугування, знівелювати цитотоксичність кріопротектору за позитивних температур та зменшити час від моменту відтавання до використання сперматозоїдів для запліднення методом ICSI.

ПВП відноситься до класу штучних полімерів і є продуктом полімеризації N1 – вінілпірролідону і ацетилену. Молекула ПВП має гідрофільно-гідрофобними властивості. У водних розчинах молекули цієї речовини мають хаотичну спіральну конфігурацію, що дозволяє їм гідратувати достатню кількість молекул $H_2O$.

Вперше ПВП був синтезований В.Реппе у 1939 р. методом полімеризації у воді в присутності пероксиду водню та аміаку [63].

В силу добре розвинених гідратаційних властивостей ПВП, характер заморожування розчинів змінюється – процес кристалізації зміщується в більш низькотемпературну область [64].

Розчини ПВП мають високі адсорбційні властивості до води і різних речовин, здатністю комплексоутворення по відношенню до лікарських препаратів, токсинів, барвників і солей. Також, вибір у якості кріозахисного агента саме ПВП був обумовлений позитивними результатами, отриманими під час кріоконсервування деяких видів клітин: лімфоцитів периферичної крові, клітин кісткового мозку експериментальних тварин та інших біологічних об’єктів [65–67]. Присутність цієї полімерної речовини в середовищі кріоконсервування сприяє стійкому стану мембрани клітини, який запобігає елімінації вмісту клітини через плазматичну мембрану навіть в умовах осмотичної напруги [68].

В ембріологічному етапі ДРТ 10% ПВП Mr 360 000 застосовується для спрощення мікроманіпуляцій зі сперматозоїдами, сповільнюючи або зменшуючи їх рухливість під час інтрацитоплазматичній ін’єкції в ооцит (ICSI) [69].

ПВП також використовується для підтримки росту незрілих ооцитів великої рогатої худоби, які культивуються *in vitro* у комплексах клітин кумулюсу та гранульози. При використанні середовища ПВП, здатність незрілих ооцитів, отриманих із яєчників великої рогатої худоби, запліднюватись та розвиватися до стадії бластоцисти *in vitro* зростала [70]. ПВП успішно застосовується для внутрішньоцитоплазматичної ін’єкції сперматозоїда (ICSI) з метою збільшення в’язкості розчину сперматозоїда, полегшуючи таким чином обробку та імобілізацію окремих сперматозоїдів як у домашніх тварин, так і у людини [71,72]. ПВП може бути використаний для регулювання обробки рідини в ін’єкційній піпетці та обмеження кінцевого об’єму, який вводиться в ооцит [71].

Було показано, що ПВП є відносно безпечним для клітин та не призводить до незворотних змін клітинної структури. Наприклад, під час ICSI сперму спочатку суспендують у середовищі, яке містить ПВП, після чого вибирають окремий сперматозоїд та вводять до ооциту, разом із невеликою кількістю середовища, що є неминучим [73]. Показано, що ПВП не впливав на цілісність генетичного апарату майбутнього ембріону, хоча автори все ж таки припускають імовірність такого впливу [74].

Саме використання методу вітрифікації спонукало до пошуку оптимальних кріоконтейнерів, які мають забезпечити понадвисокі швидкості охолодження та високу частоту виживання клітин, а також спростити пошук поодиноких сперматозоїдів після відтавання.

Для кріоконсервування сперматозоїдів чоловіків з ОАТ були випробувані як біологічні, так і небіологічні носії, хоча на сьогодні не проводилось жодних перспективних рандомізованих досліджень, щоб продемонструвати, що будь-який окремий носій перевершує інші.

У 1997 р. J. Cohen із співавторами було запропоновано використовувати порожню *ZP* людини. Дослідники стверджували, що це є найкращим способом зберігання чоловічих гамет. Але, на жаль, при використані цього біологічного матеріалу є висока імовірність контамінації сперматозоїдів. Крім того, неможливо виключити проходження спонтанної акросомальної реакції. Ще одним недоліком є складний етап підготовки мікроконтейнера до його використання [75].

У 2003 р. Timothy G. Schuster із співавторами запропонували використовувати кріопетлі. Краплини еякуляту розміщували на кріопетлях та занурювали у рідкий азот (надшвидке заморожування) з використанням у кріопротекторній суміші 25–45% етиленгліколю [76]. Про використання мікропетель для кріоконсервування невеликої кількості гамет було заявлено у 2004 р. В. Ісаченко із співавторами. У цих дослідженнях використовували саморобні мідні петлі та кріоконсервували відкритим способом – зануренням у рідкий азот [77]. Недоліком даного способу є необхідність центрифугування після швидкого відігріву для збільшення концентрації сперматозоїдів. Крім того, відсутність закритого контейнера для кріоконсервування клітин підпадає під заборону використання контролюючими органами, оскільки існує імовірність контамінації різних зразків між собою під час перебування у кріобанку [78].

У 2008 р. A. Herrler із співавт. розробили метод кріоконсервування невеликої кількості сперматозоїдів в альгінатних мікрогранулах, які після розморожування можна було розріджувати для вилучення сперматозоїдів [79]. Але складний етап підготовки контейнера, необхідність додаткового центрифугування для виділення сперматозоїдів не дозволяють широко використовувати цей мікроконтейнер у клініках ДРТ.

У 2011 р. було запропоновано метод кріоконсервування сперматозоїдів на саморобному кріолисті. Кріопротектор змішували з суспензією клітин у співвідношенні 1:1, розміщували на кріолисті та одразу занурювали у рідкий азот [80]. Цей метод, як і описаний метод В.

Ісаченко та співавт., має суттєвий недолік – у процесі кріоконсервування сперматозоїди контактують з рідким азотом, що є неприпустимим щодо використання в клінічній практиці.

У ряді досліджень було зроблено спробу використання пластикового кінчику для денудації ооцитів, який представляє собою контейнер закритого типу [81,82].

Удосконалення методів кріоконсервування включало створення мідного носія, на який наносили тонку плівку суспензії сперматозоїдів та безпосередньо занурювали у рідкий азот [83].

Процедура відтавання є не менш важливим кроком у технології кріоконсервування, оскільки швидкість нагрівання має бути такою, щоб вода всередині сперматозоїдів переходила в рідкий стан без рекристалізації. Для відтавання сперматозоїдів використовують температуру переважно 37°C. У даний час застосовується декілька методів розморожування, серед яких: відтавання за кімнатної температури протягом 10 хв з подальшим нагріванням до 37°C; відігрів у водяній бані при 37°C протягом 10 хв; відігрів за кімнатної температури протягом 15 хв. Після відтавання сперматозоїди відокремлюють від середовища кріоконсервування шляхом промивання в культуральному середовищі та двократного центрифугування [84].

M. Mansilla зі співавт. намагалися визначити оптимальну температуру нагрівання після кріоконсервування і виявили, що прогресивна рухливість сперматозоїдів, які були відігріті за 42°C, була значуще вищою, ніж відігрітих за 38°C та 40°C [85]. Аналогічні результати були отримані й іншими дослідницькими школами [84,86].

Проаналізувавши наукову літературу, можна дійти висновку, що способи кріоконсервування сперматозоїдів для нормозооспермії успішно використовуються у клінічній практиці. Загальноприйнятий метод вимагає видалення гліцерину із суспензії після відтаванні зразка. Цей етап неможливо здійснити без центрифугування. Для кріоконсервування

сперматозоїдів при ОАТ цей метод не є оптимальним, оскільки кількість нормальних сперматозоїдів після цього втручання різко знижується [87].

Видалення кріопротекторних сумішей шляхом центрифугування може призвести до морфофункціональних ушкоджень сперматозоїдів, особливо при ОАТ і зниженню їх фертильності. Таким чином, розробка способу кріоконсервування, який не передбачає вилучення кріопротектору із клітинної суспензії, є актуальною проблемою кріобіологічних досліджень.

## 1.2 Роль морфофункціональних та ультраструктурних характеристик чоловічих гамет у їх кріорезистентності

Сперматозоїд – вузькоспеціалізована клітина, основною функцією якої є запліднення яйцеклітини. Це одна з найменших клітин в організмі людини [88]. Вони мають найбільш високе співвідношення площі поверхні до об’єму, мінімальну кількість внутрішньоклітинної рідини та максимально компактований генетичний матеріал у порівнянні з усіма іншими клітинами багатоклітинних організмів. Клітини еволюційно підготовлені до перенесення різноманітних стресових умов зовнішнього середовища для збереження та передачі неушкодженою генетичної інформації щодо успішного розвитку нового організму і тому є найбільш підготовленим об’єктом щодо низькотемпературного зберігання [2]. Проте, у процесі кріоконсервування чоловічі гамети зазнають впливу цілого комплексу стресових факторів [89-91]. Отже, для оцінки впливу факторів кріоконсервування необхідно аналізувати морфофункціональні характеристики чоловічих гамет перед та після кріоконсервування.

Загальновідомо, що за будовою сперматозоїд складається з наступних структур: голівка, яка має заовалену форму – найважливіша частина клітини, яка вміщує ядро з компактизованим хроматином, акросому (видозмінений апарат Гольджі), центріолі. При пошкоджені

голівки або її сегментів (відсутність акросоми, порушення мембрани, компактизації хроматину, тощо) клітина буде неспроможна до запліднення [92]. Шийка, або середня частина, є вмістом комплексу, особливим способом організованих мітохондрій та центріолі, і відповідає за наявність енергії для руху клітини. При пошкоджені цієї частини, а саме деформації мітохондрій, порушень їх організації, кріплень до голівки, тощо, спостерігається погіршення здатності до руху або його відсутність [93]. Хвіст (або джгутик) відповідає за рух клітини [94]. Має центросому та комплекс мікротрубочок типової будови для більшості джгутиків еукаріотичних клітин.

Морфологічно нормальною слід вважати чоловічу статеву клітину, яка має усі перераховані вище структурні елементи, а саме: голівку, шийку, хвіст. По-друге, розміри частин мають бути у діапазоні: голівка – довжина 5–6 мкм при ширині 3–4 мкм; шийка – 1 мкм; хвіст – середня частина – 5 мкм, основна частина – 45 мкм, кінцева частина – 5 мкм. При цьому акросомальна частина голівки клітини має бути від 40 до 70 % до площі всієї голівки [95]. При вмісті в еякуляті від 4% таких морфологічно нормальних сперматозоїдів ставлять діагноз – нормозооспермія [96]. Якщо клітини мають відхилення від вищезазначених параметрів, то такий еякулят відносять до оліго-, астено-, тератозооспермії, або сполучення усіх форм [96].

Найбільш поширеною системою морфологічного оцінювання гамет стала методика за Крюгером, яка передбачає здійснення аналізу клітин за такими параметрами: форма та розмір голівки; форма шийки та її ширина; форма та довжина хвоста клітини; співвідношення розмірів хвоста, середньої частини та голівки; вміст та стан цитоплазми; інші особливості будови клітини [97]. Для уточнення інформації щодо характеристик еякуляту були розроблені індекси численних дефектів сперматозоїдів [98,99]. Показано, що тератозооспермія пов’язана зі зниженням концентрації та відсотка рухливих клітин в еякуляті [100].

Для здійснення запліднення сперматозоїди мають бути рухливими, здатними до зв'язування із блискучою оболонкою ооцита, сигнальної трансдукції, акросомальної реакції та клітинного злиття [101]. Відсутність зазначених функцій може бути обумовлена порушеннями будови та фізіології сперматозоїда. Тому для характеристики біологічної повноцінності гамет необхідно використовувати комплексну оцінку еякуляту [90].

Отримання максимальної кількості функціонально повноцінних сперматозоїдів завжди ставили за мету під час розробки протоколів кріоконсервування. Відомо, що збереження клітин при заморожуванні істотно залежить від того, з якою швидкістю відбувається охолодження в температурних інтервалах, які відповідають структурним перебудовам у кріозахисних середовищах, як то кристалізація, евтектика та рекристалізація на етапі відігріву, плавлення кристалів льоду [90, 102, 103].

Багато дослідників приділяли увагу стану морфологічних характеристик сперматозоїдів після кріоконсервування. Велика кількість робіт присвячена вивченню структури сперматозоїдів після повільного кріоконсервування під захистом гліцерину.

Цілком очевидно, що будь-які пошкодження тіла, хвоста або голівки можуть патологічно вплинути на фертильність. У головній частині сперматозоїда розміщені гаплоїдне ядро, акросома та центріоль. При патологічних станах у головці з'являється вакуолізація. Походження ядерних вакуолей залишається спірним питанням. Деякі автори показують, що вакуолі є наслідком конденсації хроматину в ході сперматогенезу [100].

N. Gatimel зі співав. повідомили, що повільне заморожування не підвищує вакуолізацію сперматозоїдів [105]. З іншого боку, F. Biotrelle зі співавт. повідомили про зменшення кількості рухливих сперматозоїдів та індукцію вакуолізації після повільного заморожування [106]. Також повідомлялося, що ультраструктура голівки кріоконсервованих сперматозоїдів була змінена: хроматин у нативних сперматозоїдах був

більш конденсованим, також було виявлено збільшення ядерних вакуолей [107]. Вважається, що кріоконсервування спричиняє пошкодження як хвостових, так і головних областей сперматозоїдів, які можна побачити не тільки за допомогою ультраструктурного аналізу методом електронної мікроскопії, але й методом світлової мікроскопії [108].

Прояви шкідливої дії кріоконсервування різноманітні і стосуються різних рівнів біологічної організації клітини. Відомо, що процес заморожування-відтавання може призводити до сублетальних пошкоджень гамет, що тягне порушення їх запліднюючої здатності [109].

Застосування кріоконсервованих сперматозоїдів у клінічній практиці висуває низку вимог. По-перше, необхідно не тільки забезпечити високу рухливість сперматозоїдів після відтавання, а й зберегти їх основний функціональний параметр – запліднюючу здатність.

По-друге, до кріоконсервованих гамет, як до носіїв генетичної інформації ставляться підвищені вимоги. Тому для оцінки ефективності режиму заморожування статевих клітин доцільно використовувати комплекс морфологічних та функціональних тестів, який дозволяє найбільш повно оцінити збереження сперматозоїдів на різних етапах кріоконсервування.

У процесі дозрівання голівки сперматозоїда відбувається збільшення стабільності хроматину в результаті формування дисульфідних зв’язків між ядерними протамінами і зниження вмісту тіолових груп в ядрі. Для диференціювання сперматозоїдів, які містять конденсований та деконденсований нуклеарний хроматин, використовується метод фарбування акридином помаранчевим. Акридин помаранчевий флуоресціює зеленим кольором, коли зв’язується з нормальною подвійною ниткою ДНК, і червоним, коли зв’язується з денатурованою або одиночною ниткою ДНК. Результати цього тесту не корелюють з концентрацією і рухливістю сперматозоїдів, проте корелюють з морфологічними характеристиками сперматозоїдів.

Рухливість сперматозоїдів залежить від адекватної продукції метаболічної енергії як аеробним, так і анаеробним шляхом. Окислювальна діяльність, яка необхідна для аеробного метаболізму та виробництва метаболічної енергії у формі АТФ, відбувається в мітохондріях [110]. Мітохондріальний мембранний потенціал (ММП) є показником мітохондріального та клітинного енергетичного стану і може бути використаний для оцінки активності дихального ланцюга та електронно-транспортної системи.

Різні дослідження показали кореляцію між порушенням мітохондріальної функції (зниження ММП) та зниженою рухливістю сперматозоїдів [111]. F. Gallon та ін. продемонстрували, що субпопуляція сперматозоїдів з високим вмістом ММП складається з клітин з нормальними морфологічними характеристиками, підвищенною рухливістю та високою здатністю до акросомальної реакції – усіма важливими параметрами для запліднення [112].

Незважаючи на те, що вплив кріоконсервування на морфологічні характеристики клітин вивчено з залученням різних методичних та методологічних підходів, на сьогоднішній день у літературі не існує згоди щодо того, чи впливає цей процес на цілісність ДНК. У деяких дослідженнях автори повідомляють про значний вплив [113], тоді як інші дослідники висловлюють протилежну думку [114]. Цю суперечку можна пояснити використанням різних програм заморожування, різними тестами оцінки стану ДНК та різними методами підготовки сперматозоїдів, а також необхідністю видалення кріопротектору.

Аналіз наукової літератури дозволив з’ясувати, що на сьогодні розроблено та ефективно впроваджено в практику функціонування клінік ДРТ методи кріоконсервування сперматозоїдів за нормозооспермії. «Золотим стандартом» прийнято метод повільного програмного заморожування з 5-10% розчину гліцерину у якості кріопротектору. Показано, що кріоконсервовані сперматозоїди зберігають свою

морфофункціональну цілісність і можуть бути використані для запліднення ооцитів методами IVF та ICSI. В той же час проблема кріоконсервування сперматозоїдів чоловіків з ОАТ не вирішена. Запропоновані розробки мають експериментальний характер. Хоча ефекти кріоконсервування на запліднювальну здатність, рухливість, морфологічні характеристики та життєздатність сперматозоїдів добре задокументовані, все ще залишається відкритим питання про можливу зміну цілісності ДНК та визначення факторів, які їх індукують.

## 1.3 Роль батьківського геному у ранньому ембріогенезі

Зменшення рухливості сперматозоїдів та зміна кількості морфологічно нормальних форм можуть впливати на ефективність запліднення через негативний вплив факторів кріоконсервування на мембрани, акросомальну структуру та активність акрозину [84]. Фактори кріоконсервування можуть вплинути на структуру ДНК, що призведе до потенційного ризику деконденсації ядра сперматозоїда після введення в ооцит, і, таким чином, знизить частоту запліднення. Однак сукупний ефект кріоконсервування на здатність до запліднення ооцитів відігрітими сперматозоїдами остаточно не встановлений. Аналізуючи дані літератури щодо зміни морфофункціональних та ультраструктурних характеристик сперматозоїдів, спричинених кріоконсервуванням, можна припустити, що це може вплинути на основні ембріологічні показники.

Вважається, що ооцит здатний репарувати порушення батьківської ДНК [115]. Він відновлює пошкодження ДНК батьківських геномів одразу після запліднення, проте ця здатність залежить не лише від типу та ступеня пошкодження ДНК, а й від якості ооциту [116].

До недавнього часу вважали, що сперматозоїд виконує єдину функцію – доставляє генетичну інформацію в яйцеклітину, а цитоплазма ооцита містить всі фактори, які необхідні для утворення ядра *de novo*. У

цій моделі реорганізація батьківського хроматину після запліднення була абсолютною. Вважалося, що ніякі аспекти упаковки ДНК сперматозоїда під час сперматогенезу не впливають на зиготу і потомство успадковує від батька тільки послідовність ДНК. Виявилося, що зигота успадковує деякі елементи з хроматину сперматозоїда, які містять необхідні епігенетичні сигнали для правильного розвитку ембріона [117]. Епігенетичні модифікації генів *H19-IGF2, RASGRF* і *DLK1-GTL2* впливають на ембріональний розвиток і навіть плацентацію [118].

Під час запліднення сперматозоїд передає в ооцит не тільки ядерну ДНК, але і фактор активації, центросоми і множинні матричні РНК і мікроРНК. Цей комплекс доповнюють некодуючі мікроРНК і інші некодуючі РНК, які можуть відігравати важливу роль після запліднення, надаючи згодом негативний вплив на ембріогенез [119].

Сперматозоїд з пошкодженою ДНК може завершити початковий процес запліднення, однак онтогенетично необхідні гени пошкодженої ДНК можуть перешкоджати ембріональному розвитку при активації ембріонального геному [120]. Фрагментація ДНК сперматозоїдів перешкоджає активному процесу деметилювання та порушує введення гістонів у чоловічий хроматин у чоловічому пронуклеусі після запліднення [121]. Крім того, вона корелює із хромосомною нестабільністю і затримкою розвитку на стадії бластоцисти і аномаліями розвитку після імплантації [122].

Першим епігенетичним внеском сперматозоїда є центросома, центр утворення мікротрубочок клітини. Правильний збір та функціонування мікротрубочок є необхідним для розходження хромосом при мейозі та їх міграції в чоловічі та жіночі пронуклеуси [123].

Сперматозоїд забезпечує 50% ядерної генетичної інформації, яка характеризує диплоїдний організм. Цитоплазма яйцеклітин забезпечує контроль експресії генів чоловічого геному [124]. Цілісність генома

сперматозоїда є важливою умовою нормального розвитку ембріона, і ця цілісність є критичною для досягнення успішної вагітності.

Більшість авторів доводить, що частота запліднення ооцитів після запліднення нативними чи кріоконсервованими сперматозоїдами тотожня [125]. Проте деякі дослідження демонструють зниження частоти запліднення ооцитів після їх інсемінації кріоконсервованою спермою та пропонують використовувати кальцій іоноформ для активації запліднення [126,127].

Ефективність репарації ДНК ооцитами може залежати від віку жінки [128] та генотипу матері [129]. На відміну від ооцита, батьківський внесок в ембріон здійснюється через сильно диференційовану транскрипційно інертну клітину з мінімальною цитоплазмою. Гаплоїдний сперматозоїд має ДНК в об’єм < 10% ядра соматичної клітини. Цей рівень ущільнення геному пов’язаний з заміною гістонів. Аргінін дозволяє отримати більш високий ступінь ущільнення хроматину, тоді як цистеїн надає підвищену стабільність через міжмолекулярні дисульфідні поперечні зв’язки, тим самим утворюючи основний блок упаковки протаміну [130].

У багатьох дослідженнях було оцінено вплив кріоконсервування сперматозоїдів на морфофункціональну цілісність ембріонів на стадії 2-8 бластомерів та на морфокінетичні характеристики бластоцисти. Результати показали, що морфологічні характеристики ембріона 2 та 3 дня розвитку та морфокінетика утворення бластоцисти не залежать від того який саме сперматозоїд приймав участь у заплідненні: кріоконсервований чи нативний [131].

Отже, проаналізувавши дані літератури можна стверджувати, що актуальним питанням є розробка протоколів кріоконсервування сперматозоїдів людини у чоловіків з вадами сперматогенезу та визначення впливу кріоконсервування, зокрема, з ПВП, на частоту запліднення та морфокінетичні характеристики ембріонів, отриманих після запліднення ооцитів кріоконсервованими сперматозоїдами. На сьогоднішній день у

літературі представлено лише декілька масштабних досліджень репродуктивного результату використання відігрітих сперматозоїдів, переважно, заморожених із гліцерином, тому вивчення сперміологічних та ембріологічних параметрів циклів ДРТ із використанням сперматозоїдів, кріоконсервованих з ПВП, є актуальним.

# РОЗДІЛ 2
# МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

## 2.1 Загальні положення

Дисертаційне дослідження було проведено на базі Інституту проблем кріобіології та кріомедицини Національної академії наук України (м. Харків) та Медичного центру «ДРТ – клініка репродуктивної медицини» (м. Харків). Дисертаційна робота була виконана в рамках відомчих НДР відділу кріобіології систем репродукції ІПКіК НАН України 2.2.6.58 «Вивчення змін репродуктивної функції тварин і людини під впливом кріоконсервованих клітинних препаратів та фізико-хімічних факторів» (номер держреєстрації – 0111U001197) та 2.2.6.108 «Вивчення впливу факторів кріоконсервування при вітрифікації на морфофункціональні характеристики репродуктивних клітин та ембріонів» (номер держреєстрації – 0116U003498) та № 2.2.6.128 «Обґрунтування диференційованого підходу до кріоконсервування репродуктивних клітин з урахуванням їх вихідного стану та видоспецифічності» (номер держреєстрації – 0120U100546), в яких автор самостійно виконувала окремі розділи, отримані результати були включені до звіту відділу.

Для проведення оцінки структурно-функціональних та цитоморфологічних характеристик сперматозоїдів було досліджено 88 еякулятів пацієнтів, які проходили лікування безпліддя у медичному центрі «ДРТ-клініка репродуктивної медицини» м. Харків з діагнозом ОАТ. В якості контролю були відібрані 18 еякулятів з нормоспермією.

## 2.2 Етичні аспекти досліджень

Усі дослідження виконані з дотриманням правил біомедичної етики відповідно до наказу МОЗ України від 09.09.2013 № 787, принципів

Гельсінської декларації прав людини, Конвенції Союзу Європи щодо прав людини і біомедицини, рекомендацій ESHRE та ARSM , та узгоджені комітетом із біоетики ІПКіК НАН України (Протокол № 4, 2016 р. та № 1, 2021 р.). Для роботи з сперматозоїдами та ретроспективного оцінювання протоколів лікування було отримано письмову інформовану згоду пацієнтів.

## 2.3 Схема експериментів

Проведені в дисертаційному дослідженні експерименти виконували за наступної схемою.

1. Аналіз еякуляту за рекомендаціями ВООЗ
2. Розділення еякуляту на аліквоти
3. Виділення сперматозоїдів із еякуляту з використанням градієнту щільності
4. Експозиція сперматозоїдів із кріопротекторами
5. Кріоконсервування сперматозоїдів
6. Дослідження параметрів життєздатності сперматозоїдів:

- дослідження параметрів рухливості сперматозоїдів
- аналіз морфологічних характеристик сперматозоїдів
- ультрамікроскопічний аналіз внутрішньоклітинних структур
- аналіз фрагментації ДНК
- аналіз мітохондріального потенціалу
- визначення пенетраційної активності
- визначення запліднювальної здатності
- аналіз темпів розвитку ембріонів *in vitro*

У роботі було використано 88 еякулятів чоловіків із діагнозом ОАТ.

Для визначення оптимального способу кріоконсервування еякулят було розділено на 7 груп в залежності від використаного кріопротектору:

група 1 – контроль, група 2 – гліцерин 5%, група 3 – HSA 10%, група 4 – сахароза 10%, група 5–7 – ПВП 5, 10, 15% відповідно.

У подальших дослідженнях отримані сперматозоїди розділяли на три групи: група I – сперматозоїди, кріоконсервовані з 10% розчином гліцерину, група II – сперматозоїди, кріоконсервовані з 10% розчином високомолекулярного ПВП; III – контроль – нативні сперматозоїди.

## 2.4 Аналіз еякуляту

За рекомендаціями Всесвітньої організації охорони здоров'я нормозооспермії відповідають наступні показники еякуляту: об'єм > 2 мл; концентрація сперматозоїдів > 20 млн/мл; кількість сперматозоїдів з нормальними морфологічними характеристиками > 40 мільйонів; рухливість сперматозоїдів > 50% прогресивних або > 25% швидко прогресуючих; морфологічні характеристики > 15% нормальних форм; лейкоцити < 1 млн/мл; життєздатність ≥ 75%; pH ≥ 7,2.

## 2.5 Виділення активнорухливої фракції сперматозоїдів з еякуляту

Для того, щоб виділити активнорухливу фракцію сперматозоїдів використовували методику «спливання» – «swim up» за допомогою центрифугування у двошаровому градієнті щільності (Sperm Gradient Kit (Life Global, США)) [133]. Для цього 1 мл 40% розчину Sperm Gradient Kit нашаровували на 1 мл 80% вказаного розчину у конічну центрифужну пробірку. Після цього зверху нашаровували весь еякулят та центрифугували 10 хв при 400 g (що відповідає 1800 об/хв при використані 20 см ротора центрифуги EBA (Hettich, Німеччина)). Потім видаляли надосадову рідину, осад змішували з 1 мл середовища Global total for fertilization (LifeGlobal, США), багаторазово змішували дозатором та вдруге центрифугували у тому ж режимі, після чого видаляли надосадову

рідину. На осад сперматозоїдів обережно нашаровували середовище Global total for fertilization для відмивання клітин в об’ємі 0,5-0,7 мл та розміщували у $CO_2$ – інкубаторі з 5% $CO_2$ та температурою 37°С на 1 год, встановивши пробірку під кутом 45°. Після чого, як було зазначено раніше, суспензію сперматозоїдів розділяли на 3 частини: група I – сперматозоїди, кріоконсервовані двоетапно з 10% розчином гліцерину, група II – сперматозоїди кріоконсервовані двоетапно з 10% ПВП, група III – нативні сперматозоїди, без кріоконсервування.

## 2.6 Визначення рухливості та концентрації сперматозоїдів за допомогою системи CASA

Суспензію сперматозоїдів (100 мкл) розміщували у камері для CASA (Рис. 2.1).

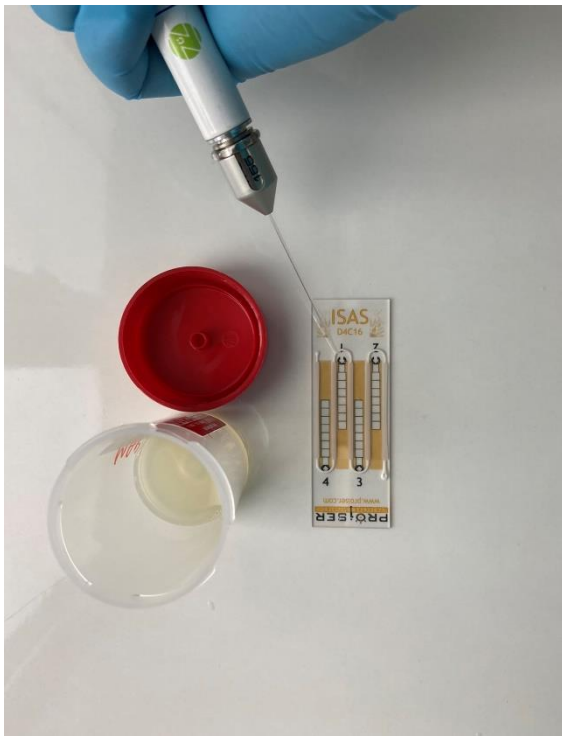



Рис. 2.1 Перенесення аліквоти сперматозоїдів у камеру ISAS.

Камеру розміщували під об’єктивом мікроскопу. Сперматозоїди підраховували за допомогою мікроскопії фазово-контрастного світла. Результати CASA були отримані безперервним повторенням 1-секундного

відео випадкового поля зору. Всі підрахунки CASA проводили при збільшенні ×200 (рис.2.2).

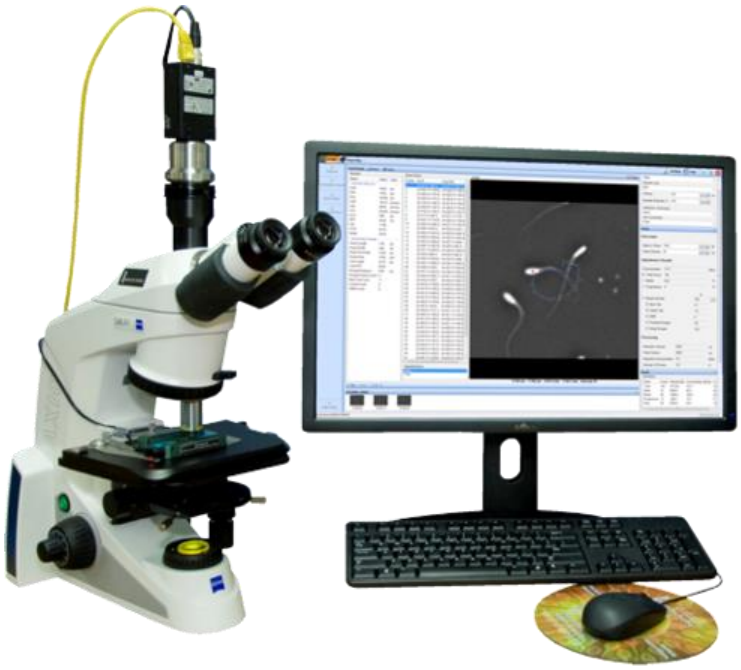


Рис. 2.2 Система CASA обчислення рухливості сперматозоїдів.

Розраховували концентрацію сперматозоїдів, їх загальну кількість, відсоток рухливих сперматозоїдів у зразку та класифікацію сперматозоїдів на нерухомі (криволінійна швидкість, VCL<5 мкм/с), локально рухомі (VCL = 5–25 мкм/с) та рухомі (VCL> 25 мкм/с) (Рис.2.3).

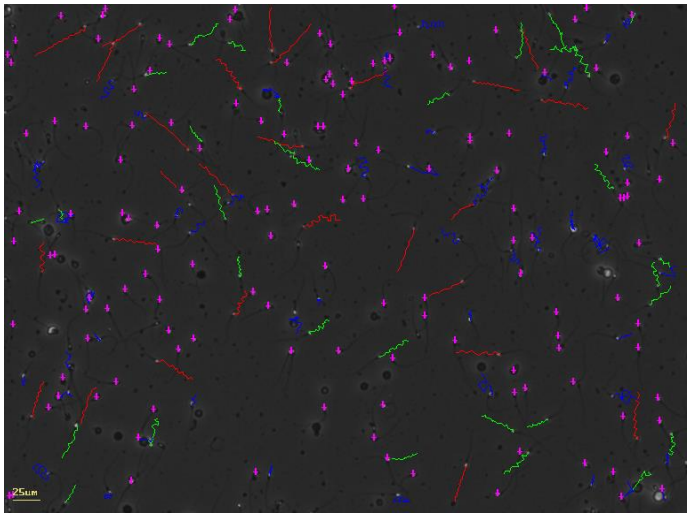


Рис. 2.3 Траєкторії рухливості сперматозоїдів: прямолінійно прогресивнорухливі (червоні), рухливі (зелені), місцево хитні (сині) та нерухомі (фіолетові).

Типи відхилень у спермограмах описували за наступною градацією:

- нормозооспермія;
- олігозооспермія – концентрація нижче $20\times10^6$/мл;
- астенозооспермія – менше 50% клітин мають прогресивний та прямолінійно прогресивний рух;
- тератозооспермія – менше 30% сперматозоїдів мають нормальну морфологію;
- ОАТ – порушення всіх вищевказаних параметрів;
- азооспермія – відсутність сперматозоїдів у еякуляті;

У дослідженнях використовували еякуляти з нормозооспермією та ОАТ.

## 2.7 Оцінка життєздатності та морфологічних характеристик сперматозоїдів після забарвлення еозин-нігрозіном

Життєздатність сперматозоїдів підраховували в мазках, пофарбованих еозин-нігрозином. Барвник містив 0,9% розчину NaCl і 0,67 г еозину в 100 мл розчину. Розчин перемішували і нагрівали на водяній бані до температури 40°С, а потім додавали 10 г нігрозину і доводили розчин до кипіння. Після охолодження барвник фільтрували і зберігали за температури 4ºС.

Для визначення життєздатності сперматозоїдів змішували рівні об’єми (по 50 мкл) барвника і суспензії сперматозоїдів, перемішували і інкубували 30 сек за 37ºС. Потім 10-15 мкл суміші переносили на знежирене предметне скло, робили мазок, висушували і досліджували під світловим мікроскопом із застосуванням імерсії. Оцінювали життєздатність клітин, а потім визначали процентне співвідношення живих і мертвих сперматозоїдів, використовуючи той факт, що в препараті голівки живих сперматозоїдів безбарвні, а голівки мертвих забарвлюються

еозином у рожевий колір. Досліджувані показники визначали після відтавання зразків вищевказаними способами.

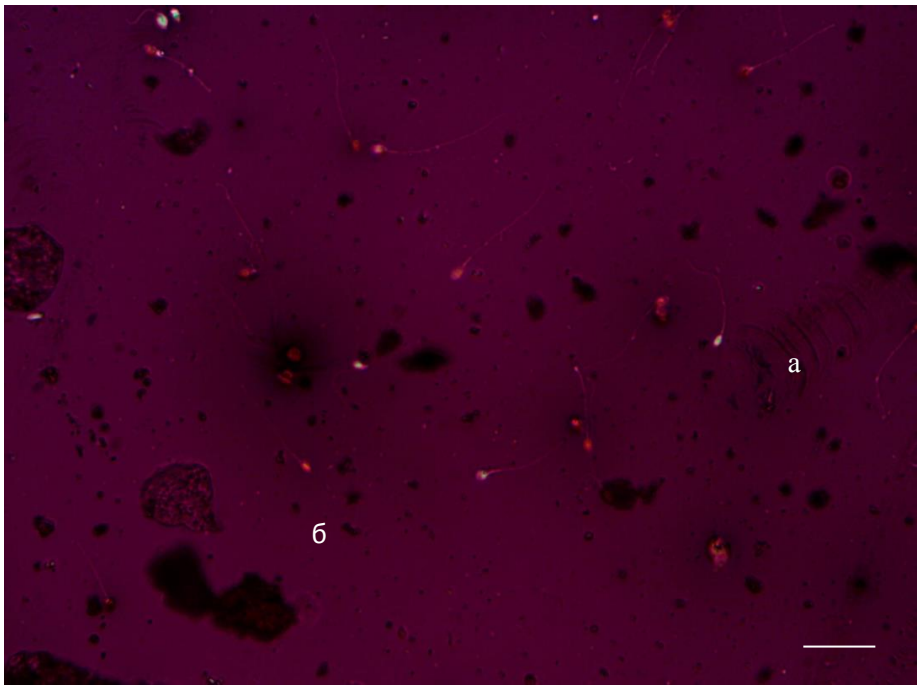



Рис. 2.4 Життєздатні (а) та нежиттєздатні (б) сперматозоїди людини. Фіксований препарат. Окраска еозин нігрозином.

Якщо мембрана сперматозоїдів не була пошкоджена, вона перешкоджала барвнику проникнути всередину, і такі клітини не забарвлювались і враховувались, як життєздатні. Якщо мембрана клітин була пошкоджена, то барвник частково або інтенсивно проникав до гамет, забарвлюючи їх, і такі сперматозоїди зараховувались як нежиттєздатні. Після такого аналізу робився висновок про відсоткову співвідносність живих/мертвих клітин.

Використовували методику фарбування мазків, при якій не виникає стискання клітин [134].

При оцінці морфологічних порушень сперматозоїдів керувалися рекомендаціями ВООЗ [90].

Сперматозоїд відносили до нормальної будови, якщо його голівка, шийка, середня частина та хвіст відповідали таким вимогам:

- голівка сперматозоїда овальної форми, співвідношення довжини до ширини від 1,50 до 1,75;
- добре окреслена акросомальна частина, яка становить 40 – 70% площини голівки;
- середня частина (шийка) – тонка, становить 1,5 довжини голівки та кріпиться до голівки вздовж її вісі.
- хвіст сперматозоїда – прямий, однакової товщини на всьому протязі, менший у середній частині, не закручений.

Сперматозоїд відносили до патологічного, якщо його головка, шийка, середня частина та хвіст мали такі порушення:

- дефекти голівки: велика, маленька, конічна, грушоподібна, кругла, аморфна. Головка з вакуолями (більше 20% площини голівки заповнено незабарвленими вакуолями), голівки з маленькою акросомальною областю (більше 40% площини голівки) та з подвоєними голівками чи будь-яка комбінація дефектів.
- дефекти шийки та середньої частини: «схилена» шийка (шийка та хвіст находяться під кутом більш 90° до довгої осі голівки). Асиметричне кріплення середньої частини до голівки, потовщена або не рівномірна середня частина, патологічно тонка середня частина або будь-яка їх комбінація.
- дефекти хвоста – короткі, множинні, у вигляді шпильки, зламані, схилені (кут більше 90°), хвости нерівномірної товщини, закручені або будь-яка їх комбінація.

Для оцінки ступеня вакуолізації виділену фракцію сперматозоїдів поміщали в краплю з ПВП для імобілізації клітин. Підраховували кількість сперматозоїдів категорії 1 – без вакуолізації, 2 – одна маленька вакуоль, 3 – одна велика вакуоль, 4 – множинна вакуолізація. Підраховували 100 клітин в кожному зразку з використанням конфокального скануючого мікроскопу Carl Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss , Німеччина) при збільшенні у 6000

разів. Для аналізу зображень використовували програму LSM Image Examiner та AxioVision Rel. 4.7 (Carl Zeiss, Німеччина).

2.8 Кріоконсервування сперматозоїдів

2.8.1 Кріоконсервування сперматозоїдів за двоетапною програмою охолодження

До суспензії сперматозоїдів групи I в співвідношенні 1:1 додавали кріозахисне середовище Sperm Freezing Medium («LifeGlobal», США). Склад кріозахисного середовища: 10% гліцерин, хлорид натрію, хлорид калію, сульфат магнію, фосфат натрію, бікарбонат натрію, глюкоза, лактат кальцію, гліцин, сахароза, HEPES-буфер, 20% сироватковий альбумін людини. До суспензії сперматозоїдів групи II в співвідношенні 1:1 додавали кріозахисне середовище 10% розчин ПВП (Mr 350 000) (Cook, США).

Суспензію клітин у кріопротекторній суміші розміщували у кріосоломинках об’ємом 0,25 мл. Об’єм кріоконсервованої суміші складав від 5 до 100 мкл, в залежності від кількості сперматозоїдів у зразку.

Режим заморожування: зразки заморожували за двоетапною програмою охолодження, витримуючи їх 10 хв на відстані 15 см від рівня дзеркала азоту (при цьому швидкість охолодження становила 150 град/хв) із подальшим зануренням у рідкий азот –196 ºС.

Кріопробірки зберігали в рідкому азоті від місяця до року.

2.8.2 Відтавання сперматозоїдів

Для відтавання клітин використовували водяну баню з температурою 42°С. Зразки відігрівали впродовж 10 хв до повного зникнення твердої фази. Видалення кріопротектору здійснювали в середовищі Sperm preparation medium («Cook», США) і проводили оцінку життєздатності сперматозоїдів шляхом підрахунку клітин з неушкодженою мембраною.

## 2.9 Прижиттєве визначення цілісності цитоплазматичної мембрани сперматозоїдів

Осморегуляторну здатність цитоплазматичної мембрани (ЦМ) сперматозоїдів визначали за допомогою гіпоосмотичного тесту (HOST) [135], який ґрунтується на тому, що у відповідь на додавання гіпоосмотичних середовищ у клітинах з неушкодженою ЦМ відбувається набрякання і закручування хвоста. Гіпоосмотичне середовище для HOST містило 1,47 г цитрату натрію і 2,75 г фруктози, розчинених у 200 мл води. Середовище вказаного складу ретельно перемішували та фільтрували в 250 мл конічну колбу. Осмолярність середовища складала 150 мОсм/л. 1 мл середовища переміщували в пробірку, яка містила 0,1 мл еякуляту, перемішували впродовж 30 с, а потім інкубували за температури 37°С впродовж 50-60 хв. Після цього краплю еякуляту наносили на предметне скло, накривали покривним склом (24×24) і оцінювали 200 сперматозоїдів під фазово-контрастним мікроскопом (×460). В інтактних і експериментальних зразках вираховували відсоток клітин із закрученими хвостами, що характеризувало неушкодженість мембрани.

## 2.10 Визначення ультраструктурних характеристик сперматозоїдів методом електронної мікроскопії

Суспензію клітин фіксували в 3%-му розчині глутарового альдегіду на фосфатному буфері Міллоніга і 1%-му розчині чотириокис осмію [136], після зневоднення етанолом і оксіпропіленом зразки переносили в епон-аралдіт. Для електронно-мікроскопічного дослідження отримували ультратонкі зрізи, контрастували уранілацетатом і цитратом свинцю і спостерігали в електронному мікроскопі ПЕМ-125К («SELMI», Україна), оснащеним системою зйомки і аналізу зображення САІ-01А («SELMI»,

Україна), що включає також CCD-камеру DX-2 і пакет програм до неї («Kappa», Німеччина) [137].

Під час електронно-мікроскопічного дослідження сперматозоїдів проводили аналіз морфології голівок, наявності або відсутності акросоми, положення акросоми (нормальне або віддалене від ядра), форми акросоми (нормальна або змінена), форми ядра, стану хроматину, наявності цитоплазматичних крапель на головці і шийці сперматозоїда, особливостей ультраструктури мітохондрій і матриксу, морфології аксонеми джгутика і періаксонемних структур.

## 2.11 Оцінка мітохондріального мембранного потенціалу сперматозоїдів.

Мітохондріальний мембранний потенціал (ММП) визначали за допомогою ліпофільного катіонного барвника 5,5‘, 6,6’-тетрахлор-1,1’, 3,3’-тетраетилбензимідазолкарбоціаніну йодиду (JC-1) відповідно до інструкцій виробника (Sigma, США). Рухливу фракцію сперматозоїдів розбавляли робочим розчином JC-1 (20 мкг / мл) у ДМЕМ (Sigma, США) без фенолу червоного при співвідношенні 1:1 та інкубували протягом п’ятнадцяти хвилин при 37 °C. Після цього клітини аналізували за допомогою конфокального лазерного скануючого мікроскопа AxioObzerver Z1 (Carl Zeiss, Німеччина). Довжина хвилі збудження становила 488 нм, викид спостерігався в зеленій зоні спектру при 520 нм, в червоній зоні при 590 нм. Кількість клітин з високим ММП підраховували в 100 сперматозоїдах у двох різних польових місцях на слайді з кожного зразка при х 600 (остаточне збільшення).

Для оцінки ММП методом проточної цитофлуориметрії забарвлення JC-1 здійснювали описаним вище способом. Цитограми отримували з використанням проточного цитофлуориметру FACS Calibur (BD Bioscience). Зразки збуджували лазером з довжиною хвилі 488 нм, а

випромінюване світло збирали за допомогою емісійних фільтрів при 530 нм (зелена флуоресценція: FL1, мономери барвника) та при 585 нм (червона флуоресценція: FL2, агрегати барвника).

Аналіз даних здійснювали за допомогою програми WinMDI 2.9. При аналізі даних, отриманих на цитограмі за параметрами прямого і кутового світлорозсіювання виділяли «регіон подій», що відповідав розмірам досліджених клітин. Далі його аналізували за параметрами флуоресценції в зеленій та червоній областях спектру (рис. 2.5). При цьому виділяли три популяції клітин: 1 – клітини, що флуоресцують в зеленій області спектра, 2 – клітини, що флуоресцують в зеленій та червоній областях спектра (подвійна флуоресценція).

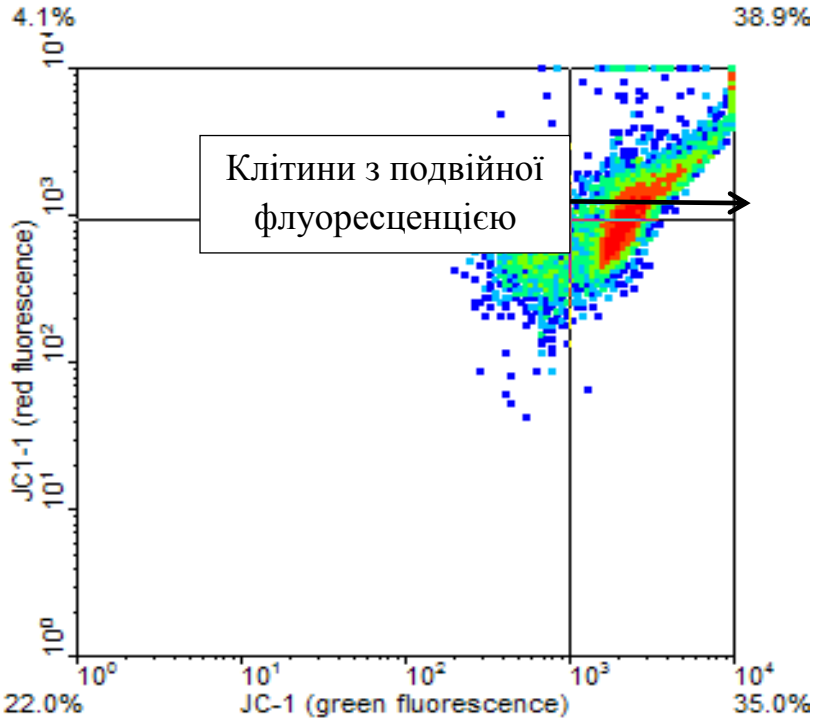



Рис. 2.5 Цитограма суспензії виділеної рухливої фракції сперматозоїдів людини, забарвленої JC-1 (проточна цитофлюориметрія).

Оцінювали зміну відносної кількості клітин, що мали подвійну флуоресценцію. Сперматозоїди, які мали подвійну флуоресценцію знаходились у верхньому правому квадраті. Ці клітини містили j-агрегати,

що свідчило про наявність високого потенціалу на мембрані мітохондрій [138].

2.12 Тест на пенетрацію з *Zona pellucida*

Незапліднені ооцити людини переносили в 0,1% розчин гіалуронідази і диспергували протягом 5-10 хв для видалення кумулюсних клітин. Потім ооцити тричі відмивали в культуральному середовищі. За допомогою мікроманіпулятора (Narishiga, Японія) і мікроголок (COOK, США) проводили видалення цитоплазми з *ZP* (Рис. 2.6).

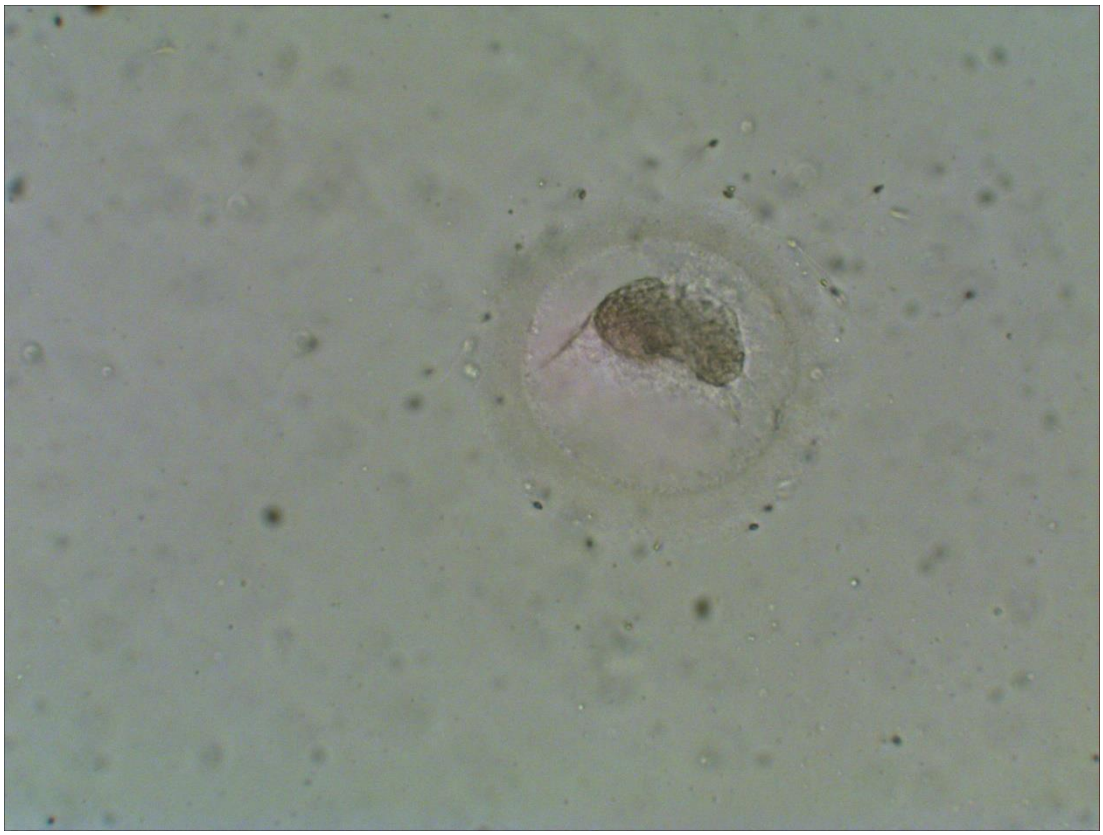


Рис. 2.6 Ооцит з дегенерацією ооплазми.

Інкубацію сперматозоїдів з *ZP* проводили в 50 мкл культурального середовища, у покритих мінеральною олією чотирилункових планшетах (Nunc, Данія) протягом 2 год.

Аналіз зразків проводили за допомогою інвертованого мікроскопа Olympus IX-71 («Olympus», Японія).

Розраховували частоту пенетрації як відношення кількості ооцитів зі сперматозоїдами в *ZP* до всіх ооцитів × 100%, а індекс пенетрації – відношення кількості пов'язаних сперматозоїдів пацієнта до кількості пов'язаних сперматозоїдів донора.

## 2.13 Запліднення ооцитів методом ICSI

До краплі середовища із полівінілпіролідоном (Cook, США) додавали 2 мкл сперматозоїдів різних досліджувальних груп. Для запліднення обирали прогресивно рухливі та морфологічно повноцінні сперматозоїди, які імобілізували пошкодженням цілісності мембрани хвостика ін'єкційною мікропіпеткою FPIP-35 (Cook, США).

За допомогою мікропіпетки-тримача HPIP-35, Holding Micropipette (Cook, США) ооцит фіксували таким чином: перше полярне тільце мало знаходитися перпендикулярно траєкторії руху ін'єкційної мікропіпетки (12 або 6 год з точки зору дослідника) (Рис.2.7).

Керуючи джойстиком, вводили імобілізований сперматозоїд з незначною частиною ПВП до цитоплазми ооциту. Після ін'єкції, ооцит переносили до культурального середовища Global total for fertilization (LifeGlobalt, США). Наявність запліднення встановлювали за наявністю двох пронуклеусів через 16−18 год після проведення ICSI.

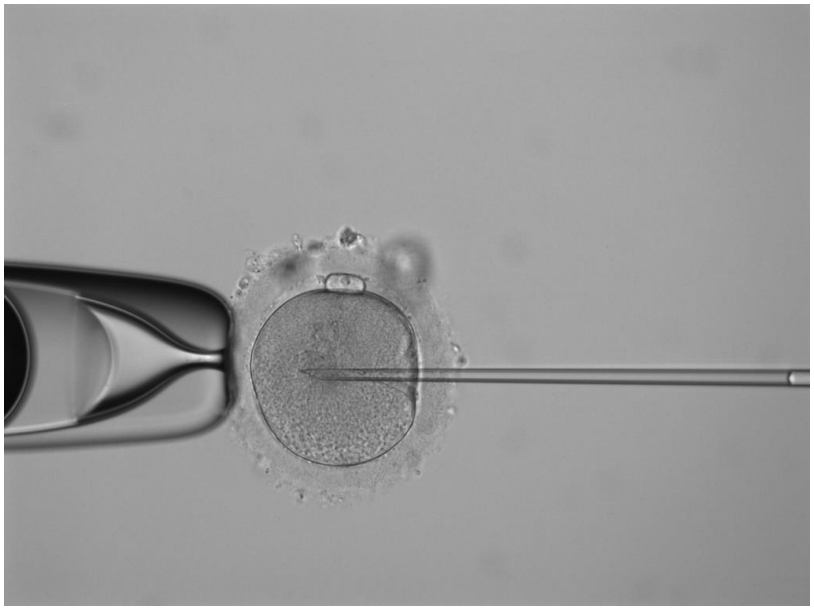


Рис. 2.7 Проведення інтрацитоплазматичної ін’єкції в ооцит.

2.14 Культивування *in vitro* та оцінка морфокінетичних характеристик ембріонів

Культивування ембріонів *in vitro* до стадії бластоцисти проводили у культуральному середовищі Global total (LifeGlobal, США), яке розміщували у чотирилункових планшетах Nunc (Nunc, США).

Контроль розвитку ембріонів проводили кожні 24 год. Оцінювали морфокінетичні характеристики ембріонів, а саме: кількість бластомерів, наявність фрагментації та багатоядерність.

Морфокінетичні характеристики ембріонів на стадії бластоцисти оцінювали за класифікацією Gardner, яка враховувала морфологічні ознаки внутрішньоклітинної маси і трофектодерми [40].

2.14.1 Оцінка ембріонів 2–3 доби розвитку *in vitro*

Морфологічну оцінку розвитку ембріонів проводили на 2 та 3 добу їх культивування *in vitro*. Оцінювали кількість бластомерів, їх розташування, наявність фрагментації.

### 2.14.2 Оцінка ембріона 5-ї доби розвитку *in vitro*

Залежно від морфологічних характеристик клітин трофектодерми та внутрішньоклітинної маси ембріони 5 доби розвитку розподіляли за Стамбульським консенсусом (рис. 2.8).

Оцінювання ембріонів людини на цій стадії розвитку проводили через 114 – 118 год після запліднення. Визначали наступні категорії розвитку бластоцисти: 1 – рання бластоциста, формується бластоцель, яка займає менше половини об'єму бластоцисти; 2 – рання бластоциста, бластоцель становить половину об'єму; 3 – повна бластоциста, бластоцель займає більше половини об'єму; 4 – розширена, бластоциста збільшена в розмірі, *ZP* стає помітно тоншою; 5 – розширена бластоциста, клітини якої починають проривати *ZP* і виходити назовні, починається хетчинг; 6 – бластоциста повністю вийшла із *ZP*.

## 2.15 Використані реактиви

Для виділення прогресивно-активної фракції з еякуляту використовували Sperm Gradient Kit («Cook», США). В якості культурального середовища використовували Global total for fertilization («LifeGlobal», США). Для фіксації клітин використовували 70% етанол («Здров'я», Харків)

Оцінку життєздатності сперматозоїдів проводили із використанням розчину еозин-нігрозину («RAL Diagnostics», Франція). Для визначення фрагментації ДНК використовували акридин помаранчевий («Sigma», США).

У якості непроникального кріопротектору використовували 10% ПВП («LifeGlobal», США), 0,25 М сахарозу («Sigma-Aldrich», США) та 10% сироватковий альбумін людини («Life Global», США). У якості

проникального кріопротектору використовували 10 % гліцерин («Sigma Aldrich», США).

Сперматозоїди фіксували в 3%-му розчині глутарового альдегіду («Sigma-Aldrich», США) на фосфатному буфері Міллоніга і 1%-му розчині чотириокису осмію.

Запліднювальну здатність сперматозоїдів оцінювали в середовищі Global total for fertilization («LifeGlobal», США). Ембріони культивували *in vitro* в середовищі Global total («LifeGlobal», США).

## 2.16 Програмне забезпечення

Створення баз даних і проведення розрахунків виконували за допомогою пакета програм Microsoft Excel for Windows XP Professional 1–2 CPU (Microsoft, США, ліцензія X08–73060). Для фото-, відеозапису етапів роботи з ооцитами та ембріонами використовували систему програмного забезпечення Cronus (Research Instruments, Велика Британія).

## 2.17 Статистичний аналіз

Статистичний аналіз експериментальних даних здійснювали з використанням програмного пакету Origin 8.5 (OriginLab Corporation, США). З використанням критеріїв Колмогорова-Смирнова і Шапіро-Уїлка були перевірені гіпотези щодо нормальності розподілів досліджуваних показників. Для величин, які мали нормальний розподіл, дані приводили у вигляді середнє ± стандартне відхилення.

Якщо досліджуваний параметр мав нормальний розподіл, при порівнянні двох груп використовували t-тест для незалежних вибірок.

При порівнянні більшої кількості груп гіпотезу про рівність середніх перевіряли за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (метод ANOVA – Analysis of Variance).

Якщо розподіл досліджуваних параметрів відрізнявся від нормального, для порівняння двох незалежних груп використовували критерій Манна-Уїтні (U-критерій); для порівняння більшої кількості незалежних груп використовували непараметричний аналог однофакторного дисперсійного аналізу – критерій Крускалла-Уолліса (H-критерій). У разі множинних порівнянь використовували критерій Манна-Уїтні (U-критерій) для попарних порівнянь значень різних груп з урахуванням поправки Бонферроні.

Критичний рівень значущості для всіх статистичних критеріїв приймали рівним 0,05, за винятком випадків множинних порівнянь. При використанні критерію Манна-Уїтні (U-критерій) в разі множинних порівнянь критичний рівень значимості обчислювали з урахуванням поправки Бонферроні, де критичний рівень значущості p приймали рівним 0,05 / m, де m – кількість різних груп, задіяних в попарних порівняннях.

# РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ РІЗНИХ СПОСОБІВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ТА РУХЛИВІСТЬ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ПРИ ОЛІГОАСТЕНОТЕРАТОЗООСПЕРМІЇ

Для кріоконсервування сперматозоїдів людини, виділених із еякуляту чоловіків, при нормозооспермії в якості «золотого стандарту» використовують двоетапний спосіб заморожування з 10% розчином гліцерину [3].

Особливого негативного впливу при кріоконсервуванні стандартним способом із гліцерином зазнають сперматозоїди чоловіків зі зниженими морфофункціональними характеристиками, а саме при олігоастенотератозооспермії, однією з особливостей патогенезу якого є низька концентрація клітин, їх зменшена кінетична активність і збільшення патологічних форм.

Тому метою першого етапу дослідження було оцінити вплив кількості сперматозоїдів у пробі на життєздатність та збереженість клітин після кріоконсервування стандартним способом (Рис. 3.1). Для цього було використано 10 еякулятів пацієнтів з діагнозом нормозоспермія. Після виділення активнорухливої фракції сперматозоїдів кожну пробу розводили до концентрації $200\times10^6$ кл/мл, після чого робили аліквоти з концентрацією у 10 разів нижче, ніж попередня. Найменьша концентрація у пробі становила 2000 кл/мл. Далі всі зразки інкубували у стандартному середовищі з гліцерином, заморожували, а після відтавання видаляли кріопротектор та оцінювали рухливість та життєздатність гамет.

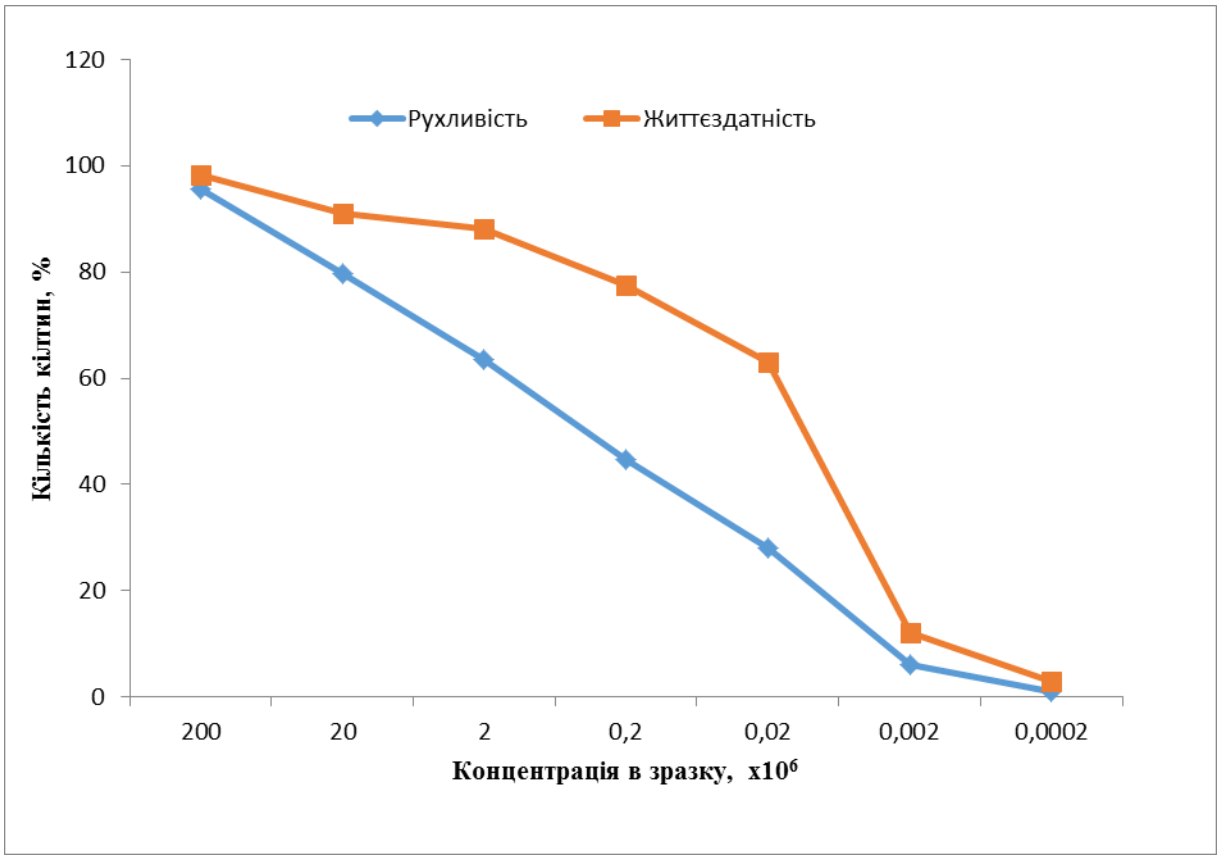



Рис 3.1. Вплив вихідної концентрації сперматозоїдів у зразку на їх рухливість та життєздатність після кріоконсервування.

Показано пряму залежність життєздатності та рухливості сперматозоїдів від їх кількості в зразках перед заморожуванням ($r=0,72$, $p<0,01$). Отримані результати спонукали до використання «swim up», який з одного боку дозволить сконцентрувати клітини перед заморожуванням, а з іншого – виділяти та зберігати саме рухливі клітини.

Показано, що відносна кількість життєздатних та рухливих клітин значно збільшилася відносно клітин у цільному еякуляті (96,3 ± 3,2 та (82,2 ± 7,7)% проти 75,7 ± 4,9 та (28,3 ± 6,2)%, $p<0,05$) (рис. 3.2.)

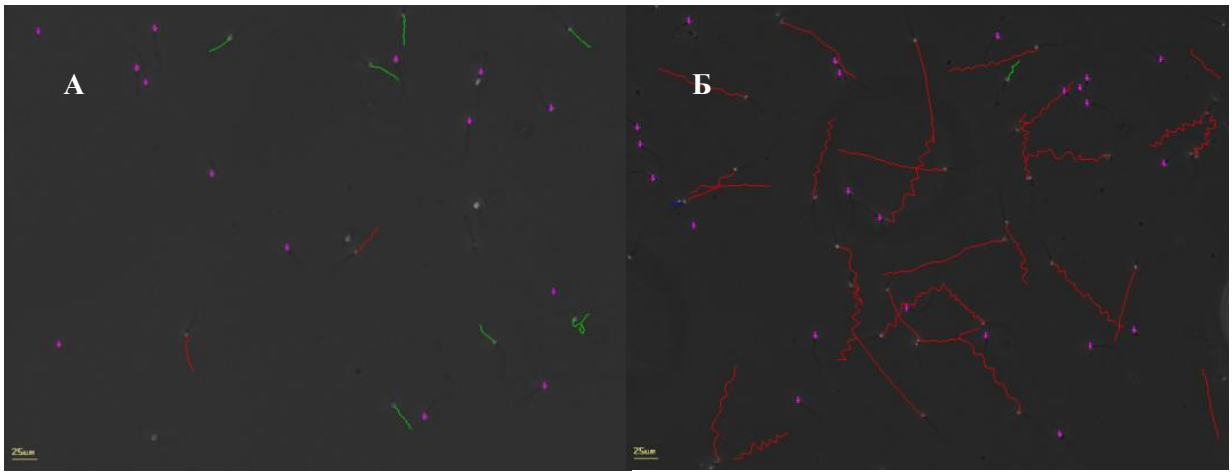



Рис. 3.2. Траєкторії рухливості нативних сперматозоїдів (прямолінійно прогресивнорухливі (червоні) та рухливі (зелені), місцевохитні (сині), нерухомі (фіолетові)). Система аналізу зображень CASA. А – цільний еякулят, Б – активнорухлива фракція.

Враховуючи ці дані, а також можливість збільшити концентрацію клітин у зразку для кріоконсервування сперматозоїдів чоловіків з ОАТ в залежності від їх вихідних кількісних показників, в подальших дослідженнях, спрямованих на покращення морфофункціональних характеристик гамет, використовували активнорухливі фракції клітин, що були виділені з цільних еякулятів.

Подальше вдосконалення методу кріоконсервування сперматозоїдів чоловіків з вадами сперматогенезу було спрямовано на пошук оптимального кріопротектору. Так, гліцерин, який використовується у багатьох методиках кріоконсервування сперматозоїдів людини, є проникальним кріопротектором, який слід видаляти із суспензії клітин після відтавання шляхом центрифугування. Ця маніпуляція спричиняє підвищення рівня активних форм кисню, тим саме викликає перекисне окислення ліпідів мембрани, фрагментацію ДНК [139].

Ми припустили, що кріоконсервування сперматозоїдів чоловіків з ОАТ у середовищах, які не потрібно видаляти після кріоконсервування, є

найбільш перспективними. Крім того, оскільки морфофункціональні характеристик ОАТ сперматозоїдів зазнають особливо нищівного впливу під час кріоконсервування, шляхом пошкодження позаклітинними кристалами льоду, то пошук нових кріопротекторів було розпочато серед непроникальних, серед багатьох яких було вибрано сахарозу та сироватковий альбумін.

Оцінювали цитотоксичність розчинів сахарози 0,2 М, 0,25 та 0,3 М у відсутності та з додаванням 10% HSA у різних середовищах. Оцінювали кількість сперматозоїдів з неушкодженою мембраною після інкубації з КС.

Життєздатність сперматозоїдів при ОАТ після інкубації протягом 30 хв з розчинами сахарози, які досліджувались, значуще не відрізнялась від цього показника для контрольних зразків. Було оцінено дію сумішей кріопротекторів при інкубації протягом 30 хв на рухливість сперматозоїдів людини при ОАТ. Значуще зниження показника рухливості спостерігалось при інкубації з КС (сахароза 0,25 М та 0,3 М ) на 24,8 та 29,1% ($p<0,01$) (Рис.3.3).

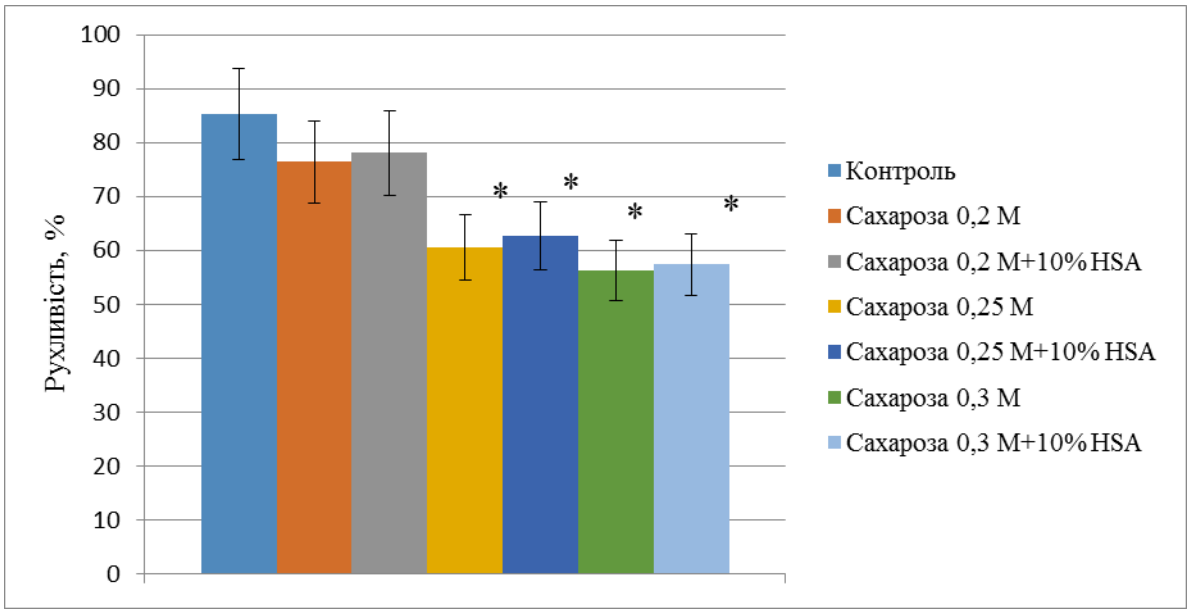



Рис. 3.3 Рухливість сперматозоїдів людини після інкубації протягом 30 хв з сумішами кріопротекторів на основі сахарози, *– різниця значуща відносно контрольних значень, $p<0,01$.

Інкубація сперматозоїдів протягом 30 хв з непроникальними кріопротекторами не призводила до змін показника життєздатності клітин відносно контролю (Рис. 3.4).

Показник рухливості сперматозоїдів після інкубації протягом 30 хв значущо знижувався при використанні сахарози 0,25 та 0,3 М.

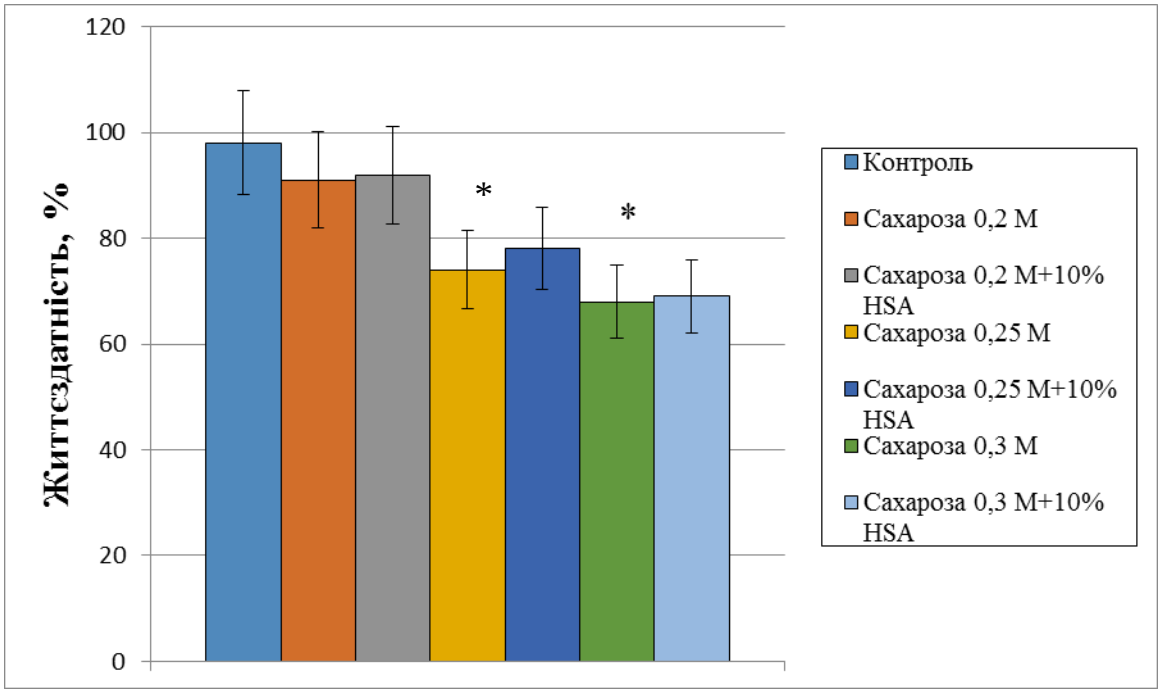



Рис. 3.4 Життєздатність сперматозоїдів людини після інкубації протягом 30 хв з сумішами кріопротекторів на основі сахарози, *– різниця значуща відносно контрольних значень, $p<0,025$.

Не дивлячись на високі показники рухливості та життєздатності сперматозоїдів після експозиції з різними кріозахисними розчинами на основі сахарози частота виживання чоловічих статевих клітин в зазначених середовищах була на низькому рівні.

Так, кріоконсервування з розчинами сахарози 0,2 –0,3 М призводило до меншої частоти виживання, порівняно з контролем ($p<0,008$) (рис.3.5).

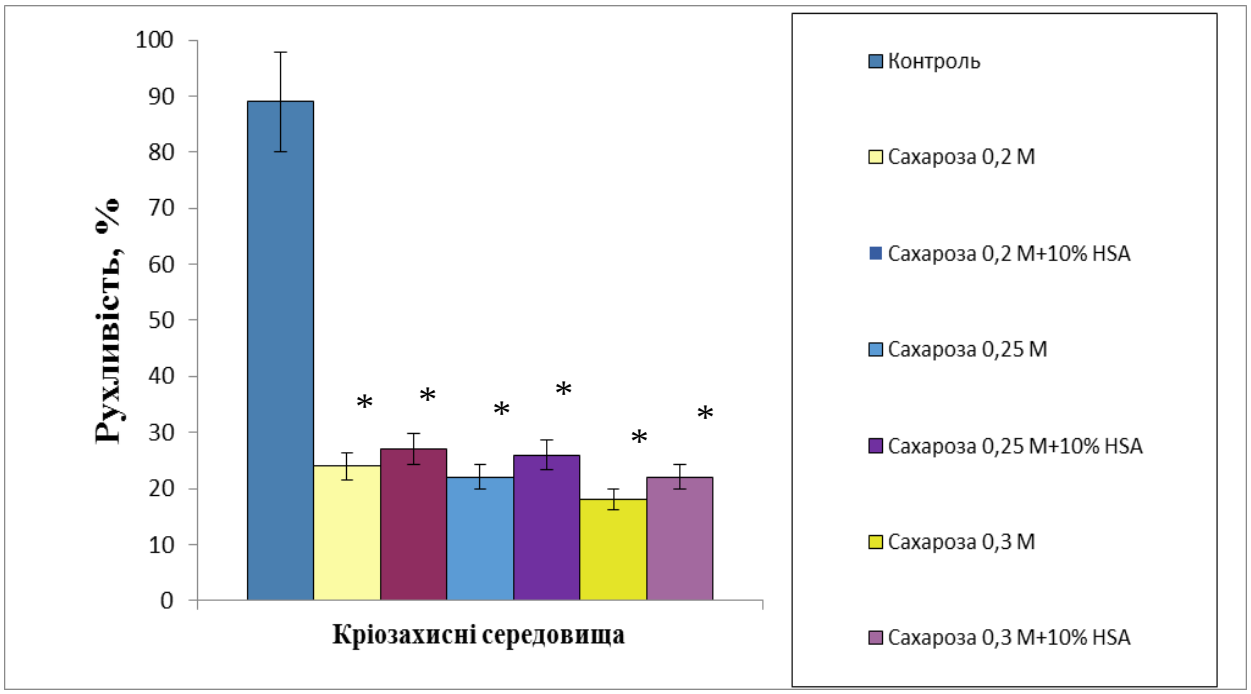



Рис. 3.5. Рухливість сперматозоїдів чоловіків після кріоконсервування з кріозахисними середовищами на основі сахарози, *– різниця значуща відносно контрольних значень, $p<0,008$.

Кріоконсервування сперматозоїдів з 0,2-0,3 М сахарози з додаванням сироваткового альбуміну призвело до показників виживання сперматозоїдів на рівні 30%, що не може бути придатним до застосування методу у клінічній практиці.

Оскільки розчини кріопротекторів на основі сахарози характеризуються підвищеною в’язкістю, ми припустили, що знижена рухливість виникає саме через ці властивості розчинів кріопротекторів.

Проте частота життєздатності сперматозоїдів, кріоконсервованих з кріозахисними розчинами на основі сахарози, залишалась на рівні 30-40% (Рис. 3.6.)

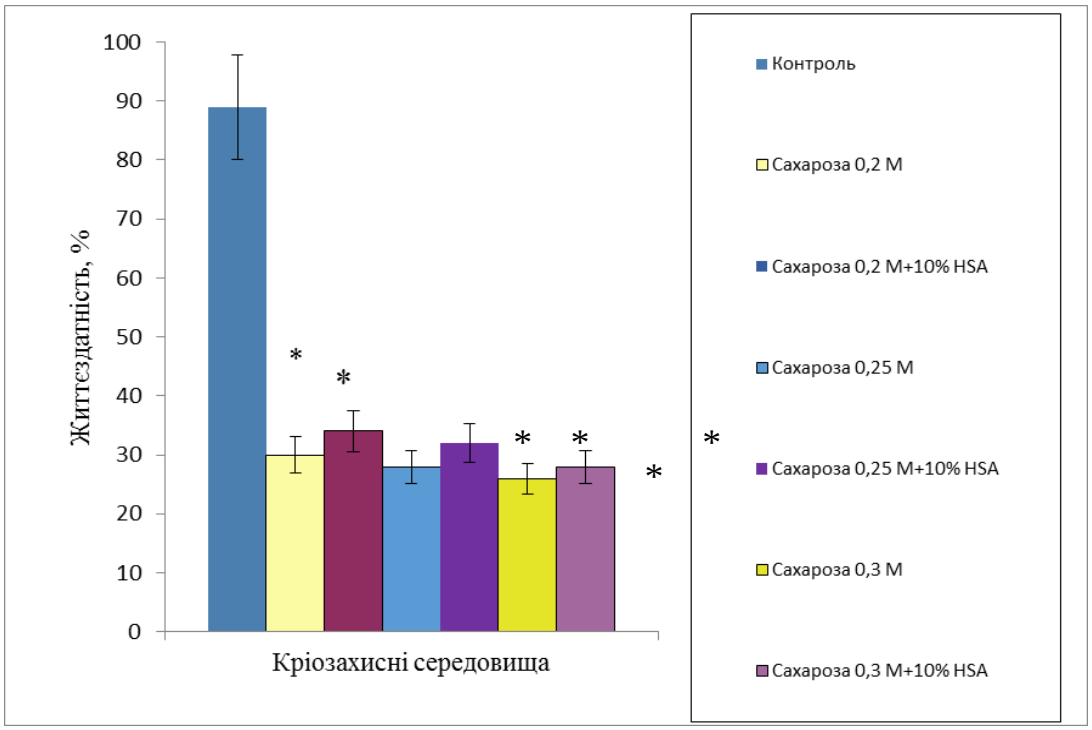



Рис. 3.6 Частота життєздатності сперматозоїдів чоловіків після кріоконсервування з кріозахисними середовищами на основі сахарози, *– різниця значуща відносно контрольних значень, p<0,008.

Концентрація сахарози в 0,2 М показала кращі властивості кріопротектору у порівнянні збільш високими концентраціями (0,25-3 М), хоча в більшості випадків сперматозоїди, кріоконсервовані з сахарозою характеризувалися низькою рухливістю.

Таким чином, на підставі проведених досліджень можна зробити висновок про низьку ефективність застосування сахарози не залежно від додавання альбуміну та осмотичності середовища, в якому її розчиняли. Це робить недоцільним її використання при кріоконсервуванні сперматозоїдів чоловіків з ОАТ.

Подальший пошук кріозахисного середовища для гамет чоловіків з ОАТ зупинився на ПВП, який широко застосовується у ембріологічному етапі ДРТ у концентрації 10% для спрощення мікроманіпуляцій зі сперматозоїдами, сповільнюючи їх рухливість при інтрацитоплазматичної ін’єкції в ооцит.

Тому наступним етапом роботи було визначення частоти виживання сперматозоїдів чоловіків із вадами сперматогенезу із використанням різних концентрацій розчину ПВП та порівняти результати дослідження з зазначеними показниками після кріоконсервування стандартним методом.

Після інкубації сперматозоїдів чоловіків з ОАТ із кріозахисними середовищами, які містили гліцерин (10%), ПВП (5, 10, 15%) встановлено, що життєздатність клітин не змінювалась відносно групи з гліцерином, тоді як рухливість значущо знизилась у всіх зразках з ПВП (рис.3.7). Це можна пояснити значною в'язкістю цих розчинів.

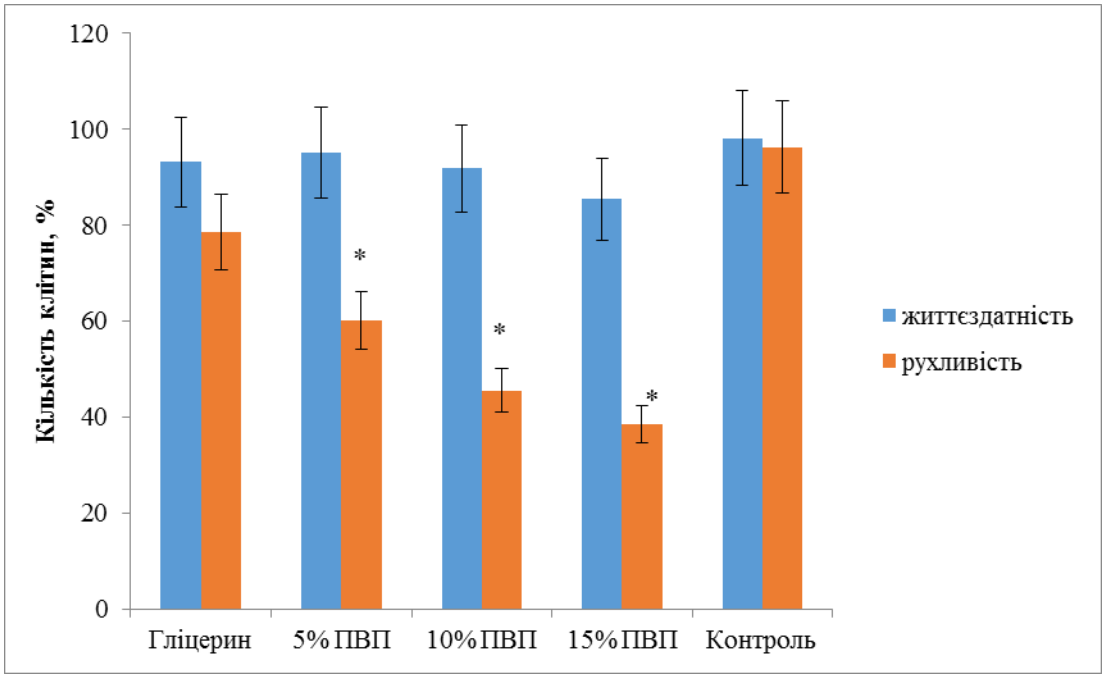



Рис. 3.7 Рівень життєздатності та рухливості сперматозоїдів досліджувальних груп після інкубації з кріозахисними середовищами. * – різниця значуща, порівняно з інкубацією в глицерині ($p<0,01$).

При використанні розчинів ПВП після кріоконсервуванн рухливість знижувалась із збільшенням концентрації полімеру у середовищі: 62,2 ± 4,3, 41,4 ± 3,8 та (32,3 ± 2,9)% при концентраціях 5,10 та 15% відповідно. Однак найвища життєздатність була при концентрації ПВП 10% (92,1 ± 8,6), а найнижча (45,2 ± 3,2%) при концентрації 5% (Рис. 3.8.).

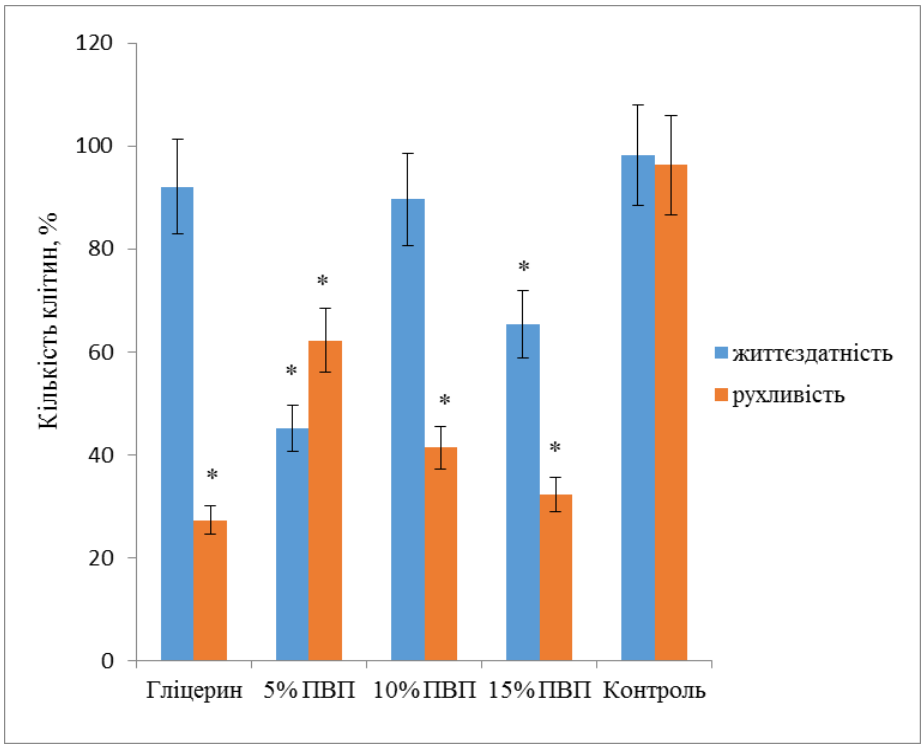



Рис. 3.8 Рівень життєздатності та рухливості сперматозоїдів досліджувальних груп після кріоконсервування. * – різниця значуща, порівняно з рухливістю сперматозоїдів в групі з гліцерином (p<0,01).

Таким чином, отримані результати свідчать, що використання ПВП у концентрації 10% є перспективним для кріоконсервування сперматозоїдів чоловіків з ОАТ, оскільки дозволяє зберегти після кріоконсервування високий рівень життєздатних клітин, при чому рівень рухливості вище ніж при застосуванні стандартного методу з гліцерином.

Таким чином, для подальших досліджень було вибрано спосіб кріоконсервування сперматозоїдів двоетапним методом з 10% розчином ПВП (група II). Для порівняння ефективності кріоконсервування ми використовували стандартний спосіб кріоконсервування з 10% розчином гліцерину (група I). В якості контролю використовували свіжовиділені сперматозоїди.

Після відтавання рухливими виявилися (78,8 ± 6,6)% сперматозоїдів, групи I та (41,4 ± 8,1)% групи II. Свою життєздатність зберегли (92,1 ±

8,6)% та (89,6 ± 8,6)% сперматозоїдів груп I та II відповідно. Зразки групи I містили проникальний кріопротектор, який необхідно було видалити, тому ми повторно оцінювали рухливість клітин після подвійного центрифугування. Незважаючи на високу частоту виживання сперматозоїдів групи I, після центрифугування і видалення кріопротектору кількість рухливих сперматозоїдів зменшилася до (27,3 ± 4,8)%. Оскільки застосування непроникальних кріопротекторів не вимагає їх виведення, їх рухливість зберігається на рівни нативних клітин (група III).

Таким чином, в результаті проведеної роботи нами було підібрано спосіб кріоконсервування сперматозоїдів чоловіків із діагнозом олігоастенотератозооспермія, який дозволив зберегти рухливість (41,4 ± 8,1)% чоловічих статевих клітин після відтавання.

За матеріалами розділу опубліковано роботи [11,12,14,16,20-24,30-32,36].

# РОЗДІЛ 4. МОРФОЛОГІЧНІ ТА УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ЛЮДИНИ, КРІОКОНСЕРВОВАНИХ МЕТОДОМ ДВОЕТАПНОГО ОХОЛОДЖЕННЯ З ПВП

Морфологічний аналіз препаратів виявив, що частота аномалій голівки сперматозоїда склала 25,97±2,67, 19,21±2,67 та (20,57±1,19)% для груп I, II та III відповідно (Таблиця 3.1). У групі I серед усіх можливих варіантів патології голівки більшу частину складали сперматозоїди з однією великою або декількома маленькими вакуолями (Рис. 4.1). Вважають, що кількість вакуолей, їх розмір і форма відображають дефекти на рівні компактизації ядра сперматозоїда [140]. Ембріони, утворені після запліднення ооцитів такими сперматозоїдами, не проходять репродуктивний добір та зупиняються на ранніх стадіях розвитку [141].

Рис. 4.1 Аномалії будови сперматозоїдів: а – вакуоль у голівці сперматозоїда, б – залом шийки, в – патологія хвоста. Фіксований препарат. Фарбування еозин-нигрозином.

Частота аномалій шийки сперматозоїдів була незначною і склала 13,04±0,98, 13,43±2,14 та (13,26±1,61)% для груп I-III відповідно. Різниця у кількості сперматозоїдів з патологією хвоста була статистично незначуща.

Сукупність дефектів голівки, шийки та середньої частини були значущо нижче у сперматозоїдах після кріоконсервування з ПВП (26,26±2,61)%, порівняно з клітинами групи I – (35,73±3,59)% (p<0,01). У нативних сперматозоїдах цей показник складав (24,88±2,44)%.

*Таблиця 4.1*

Морфологічні характеристики сперматозоїдів людини після кріоконсервування різними методами

| Показник | Група I | Група II | Група III |
|---|---|---|---|
| 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 | 36,00 ± 3,869 |

Примітка. *різниця значуща по відношенню до групи III, p<0,01.

Аномалії морфологічних характеристик можуть мати прогностичне значення щодо ефективності запліднення в програмах ДРТ [130]. Найпоширенішою вадою сперматозоїдів є ефекти голівки, а саме мікро- та макроцефалічна форма, глобулоспермія, відсутність акросоми, циліндрична та аморфна форми [142]. Їх клінічне значення описано багатьма авторами [143]. Показано, що ін’єкція в ооцит сперматозоїдів із вадами будови голівки збільшує частоту переривання вагітності, яка отримана в циклі ДРТ з використанням методу ICSI [144]. Однією із

важливих характеристик будови голівки сперматозоїда є наявність або відсутність вакуолізації.

Було з’ясовано, що (96,09±2,02)% сперматозоїдів групи III не містять вакуолей. Проте близько 4% сперматозоїдів цієї групи характеризувалося наявністю вакуолізації різних категорій: 1 – без вакуолізації, 2 –з однією маленькою вакуолею, 3 – однією великою вакуолею, 4 – множинною вакуолізацією (Рис. 4.2).

Рис. 4.2 Сперматозоїди людини з вакуолізацією: а – категорія 1, б – 2, в – 3.

Сперматозоїди з вакуолями, віднесені до категорій 2–4, в групі III зустрічалися в рівній пропорції (табл.4.2). Кріоконсервування сперматозоїдів групи I призводило до зниження кількості клітин без вакуолізації за рахунок істотного збільшення (у 13,1 рази) кількості клітин з вакуолями категорії 2 ($p<0,001$). Після кріоконсервування сперматозоїдів групи II кількість клітин без вакуолізації знаходилася на рівні контролю. Кількість сперматозоїдів категорії 2–4 мала тенденцію до зростання в порівнянні з групою III ($p> 0,05$).

*Таблиця 4.2*

Частота вакуолізації нативних та кріоконсервованих сперматозоїдів чоловіків з ОАТ

| Категорія вакуолізації | Група | | |
|---|---|---|---|
| | I | II | III |
| 1 | 77,36 ± 2,96* | 95,59 ± 1,59 | 96,09 ± 2,02 |
| 2 | 19,68 ± 2,27* | 1,50 ± 0,96 | 1,45 ± 1,01 |
| 3 | 1,54 ± 0,96 | 1,68 ± 0,89 | 1,54 ± 0,96 |
| 4 | 1,4 ± 0,95 | 1,63 ± 0,79 | 1,32 ± 0,99 |

Примітка. * – значущі відмінності у порівнянні з відповідним показником групи III ($p < 0,01$).

Морфологічна структура сперматозоїдів надзвичайно важлива для процесів запліднення та розвитку ембріонів. Наше дослідження продемонструвало, що після кріоконсервування з гліцерином рівень морфологічно нормальних сперматозоїдів значно зменшився порівняно з контролем ($p < 0,01$), що, ймовірно, спричинено процесами дегідратації та регідратації клітин та утворенням внутрішньоклітинних кристалів при використанні проникного кріопротекторів.

Метод світлової мікроскопії не є чутливим до виявлення дефектів в області шиї та хвоста [145, 146], тому визначення ультраструктурних змін будови сперматозоїдів після кріоконсервування різними методами було метою наступного розділу наших досліджень.

Сперматозоїд – високоспеціалізована клітина і порушення функціонування її будь-якого відділу може призвести до порушення основної функції сперматозоїда – запліднення.

Світлова мікроскопія, яка застосовується для рутинного аналізу сперматозоїдів, дає інформацію про такі морфологічні особливості, як: кількість голівок та хвостів сперматозоїдів, їх розміри та відносне

розташування, наявність та розміри акросоми. Ультраструктурне дослідження дає змогу вивчити ступінь конденсації хроматину та структури перинуклеарної теки, постакросомальний сегмент, центріоль, аксонему та периаксонемальну область хвоста. Аналіз препаратів з'ясував, що кількість ультраструктурних аномалій була досить високою в усіх досліджуваних групах. Так, 83,2 ± 8,1, 63,2 ± 5,1 та (60,7 ± 7,5)% та сперматозоїдів мали аномалії голівки, шийки, хвоста або їхніх ультраструктурних елементів (Табл. 4.3). Звернув на себе увагу той факт, що при ультраструктурному аналізі сперматозоїди, які містили тільки одну аномалію, були рідкісними.

*Таблиця 4.3*

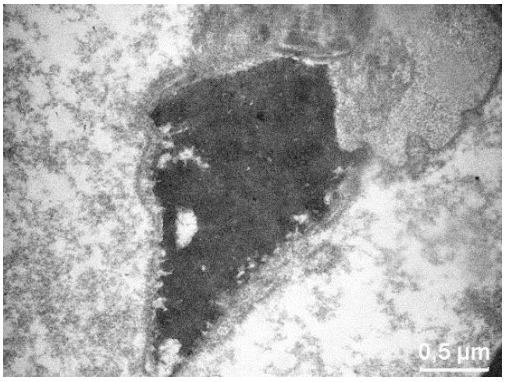
Ультраструктурні характеристики сперматозоїдів людини після кріоконсервування різними методами (M±m),%

| Показник | Група I | Група II | Група III |
|---|---|---|---|
| Аномалії голівки | 9,27 ± 2,13* | 5,27 ± 0,17 | 5,65 ± 0,19 |
| Аномалії шийки | 4,04 ± 0,31 | 5,13 ±0,44 | 5,26 ± 0,35 |
| Аномалії хвоста | 1,26 ± 1,73 | 2,99 ± 0,22 | 3,62 ± 0,15 |
| Змішана патологія | 83,20 ± 8,1 | 63,21 ± 5,12 | 60,74 ± 7,5 |
| Кількість нормальних форм | 2,23 ± 0,33* | 23,40 ± 2,14 | 24,73 ± 2,12 |

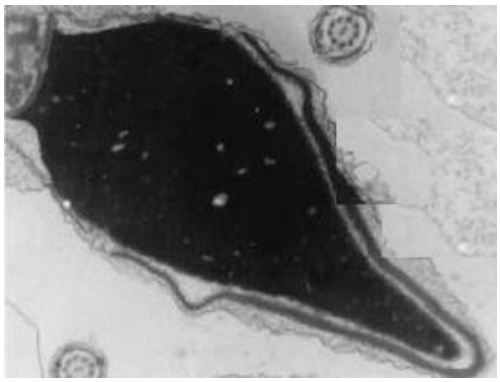
Примітка. * – різниця значуща по відношенню до групи III, $p<0,01$.

Основну частину голівки сперматозоїдів груп I-III складав конденсований хроматин, який виявляється як електроннощільний однорідний матеріал з невеликими ділянками нижчої електронної щільності (рис. 4.2). У 34,8±1,3, 26,8 ± 4,2, та (16,6 ± 1,4)% сперматозоїдів груп I-III, відповідно, спостерігали виникнення вакуолей у хроматині ядер сперматозоїдів. На передньому полюсі голівки візуалізується акросома, яка

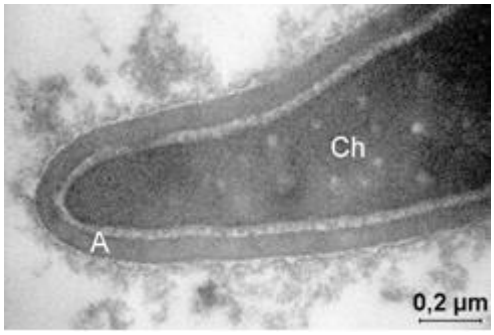
в нормі виглядає як плоска цистерна, заповнена однорідною речовиною середньої електронної щільності і покриває приблизно 2/3 передньої поверхні ядра голівки. Деградація акросоми є проявом передчасної акросомної реакції. Патологічними вважаються зміни товщини і форми акросоми [147]. В групах I–II ультраструктурні характеристики акросоми значущо не відрізнялися від таких у групі III (Рис. 4.3).




а



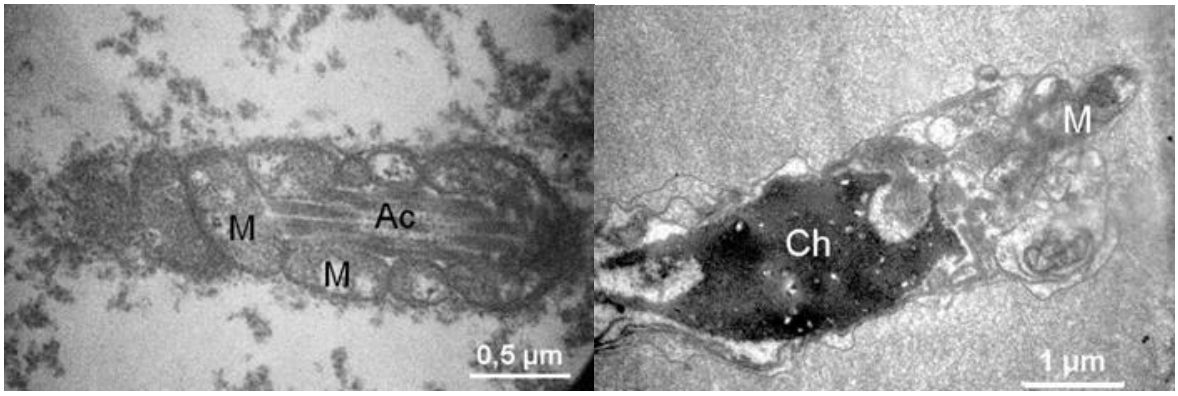
в



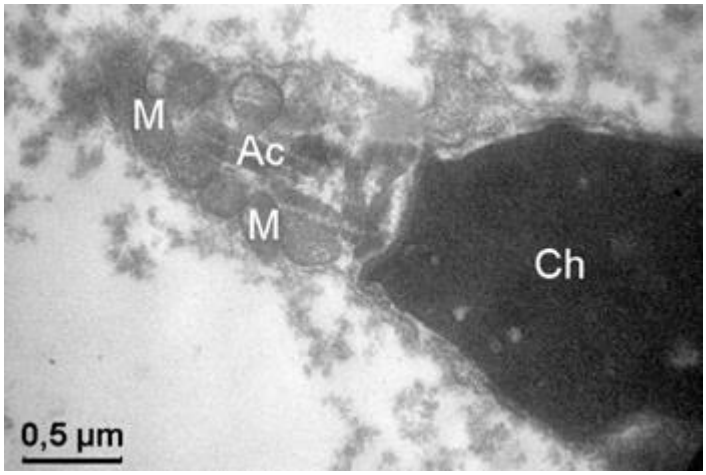

с

Рис. 4.3 Ультраструктура голівки сперматозоїда з конденсованим хроматином ядра і акросомою: a – група I, b – група II, c – група III. Позначення: Ch – хроматин; A – акросома.

Шийка сперматозоїда містить пару центріолей, які лежать під прямим кутом одна до одної, та мітохондрії. Звернув на себе увагу факт збільшення у 1,5-2 рази розмірів мітохондрій сперматозоїдів груп I-II у порівнянні з групою III (рис. 4.4).




а в

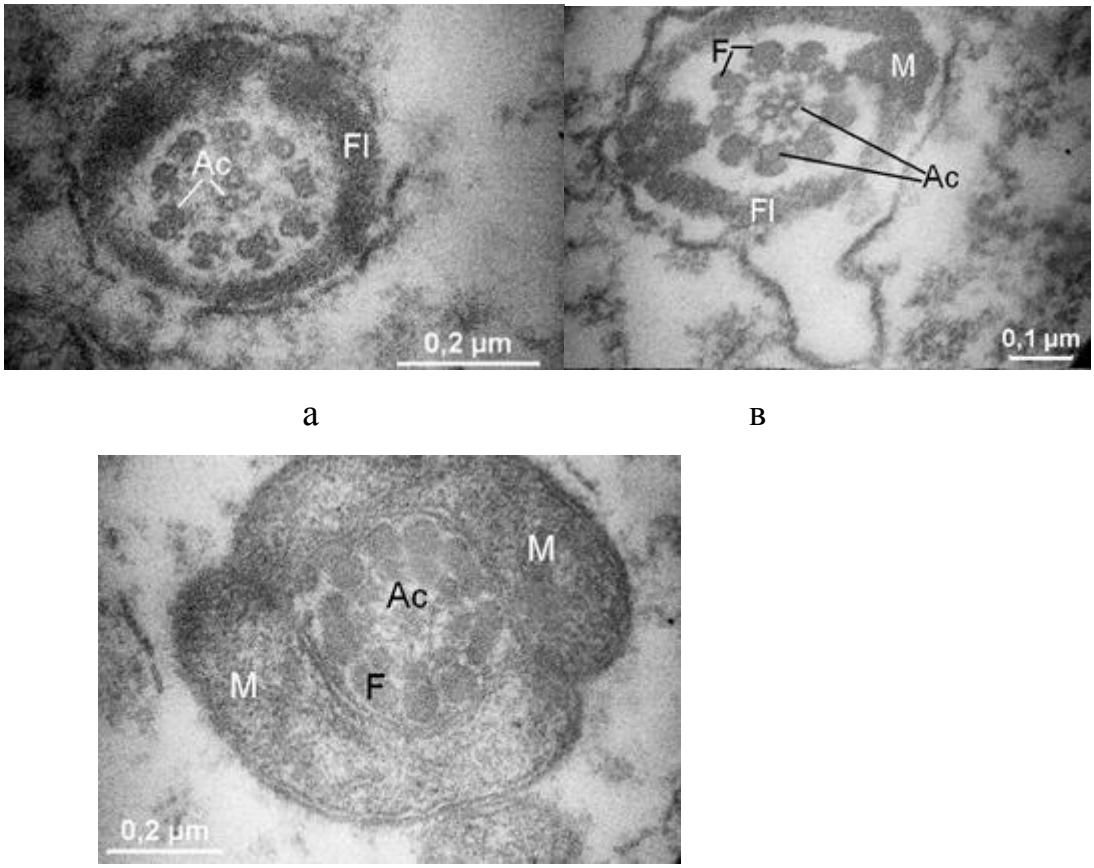



с

Рис. 4.4 Продольні зрізи шийок сперматозоїдів: a – група I, b – група II, d – група III.

Позначення: M – мітохондрії; Ch – хроматин ядра; Ac– аксонема

Ультраструктурний аналіз джгутиків сперматозоїдів досліджуваних груп виявив множинні гетерогенні зміни аксонеми та периаксонемальних структур, такі, як зміни кількості та розташування дуплетів мікротрубочок (рис. 4.5 c), форми зовнішніх щільних фібрил або архітектури фіброзного шару (рис. 4.5 a, b). Проте така картина була виявлена у сперматозоїдах усіх досліджуваних груп, можливо через те, що матеріалом дослідження були сперматозоїди з еякулятів при астенозооспермії.




а в

с

Рис. 4.5 Поперечні зрізи джгутиків сперматозоїдів: a – група I, b – група II, d – група III.

Позначення: Ac – мікротрубочки аксонеми; M – мітохондрії; F – зовнішні фібрили; Fl – фіброзний шар

За даними літератури відомо зв’язок рухливості з наступними ультраструктурними порушеннями сперматозоїдів: наявність цитоплазматичної краплі на головці та шийці, нерегулярне укладання мітохондрій, відсутність центральної пари мікротрубочок аксонеми джгутика, порушення будови пар периферичних мікротрубочок і дисплазія фіброзного шару джгутика сперматозоїда [148, 149]. Вважають, що кріоконсервування може викликати структурні порушення плазмолеми, акросоми та хвоста, які в подальшому знижують рухливість сперматозоїдів [150]. Оскільки в нашій роботі в якості кріопротекторів були застосовані речовини, які самі по собі знерухомлюють сперматозоїди, то ми не можемо

стверджувати про вплив ультраструктурних змін на їх рухливість. Тому доцільним було вивчити вплив кріоконсервування з ПВП на стан мітохондріальної активності сперматозоїдів людини.

Матеріали розділу 4 опубліковані в роботах [15,17,25,28,38,39].

# РОЗДІЛ 5. РІВЕНЬ ФРАГМЕНТАЦІЇ ДНК ТА ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ МІТОХОНДРІЙ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ЛЮДИНИ ПЕРЕД ТА ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ

Не дивлячись на те, що за даними електронної мікроскопії хроматин сперматозоїдів усіх досліджуваних груп був щільно конденсований, у групах I спостерігалася тенденція щодо збільшення кількості сперматозоїдів із зміною структури ДНК. У групі III – кількість сперматозоїдів з неушкодженою ДНК склала (80,3 ± 3,0)% (рис. 5.1). Незначне підвищення фрагментації ДНК у кріоконсервованих сперматозоїдах може бути пов'язано із окислювально-відновними процесами, які виникають у сперматозоїдах під час кріоконсервування [151].

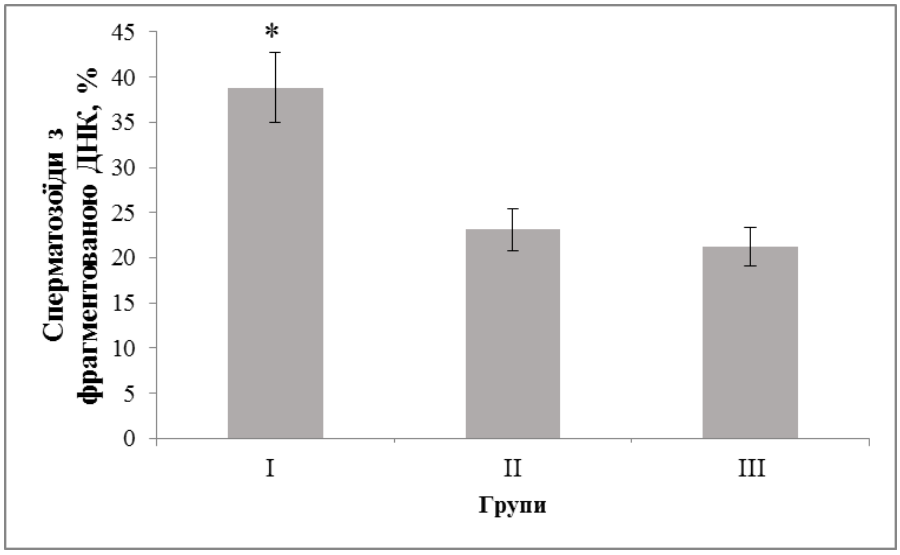
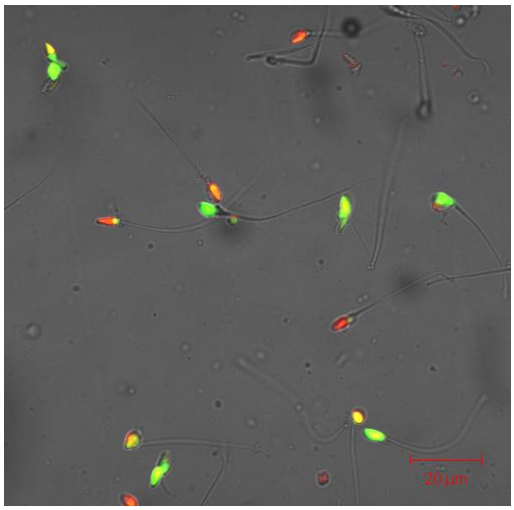


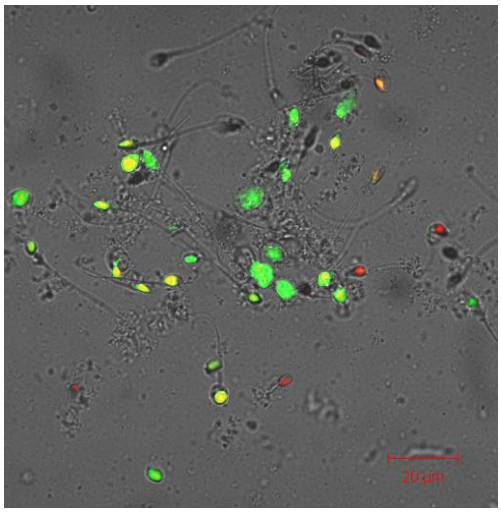

Рис. 5.1 Кількість сперматозоїдів з фрагментацією ДНК в досліджуваних групах. * – різниця значуща порівняно з групою III, ($p<0,01$).

При цьому, найменша кількість клітин з фрагментацією ДНК спостерігалася в групі III; в групі II – залишалася в межах норми (Рис. 5.2).

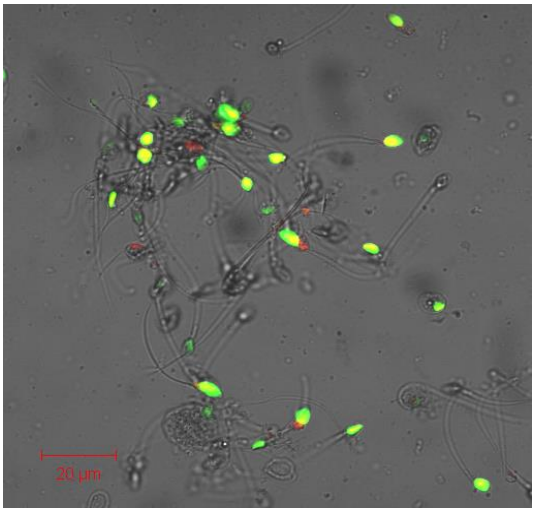
Так, після кріоконсервування в групі I кількість сперматозоїдів з фрагментацією ДНК склала 38, 8 ± 3,0, в групі II – (23,1 ± 2,5)%.




а




б




в

Рис. 5.2 Фрагментація ДНК сперматозоїдів людини а-група I, б-група II, в-група III (забарвлення акридин помаранчевим, конфокальна мікроскопія).

Функціональну активність мітохондрій сперматозоїдів визначає мембранний мітохондріальний потенціал (ММП), який корелює з рухливістю клітин [152]. Оскільки сперматозоїди чоловіків з діагнозом ОАТ мають знижені не тільки морофологічні показники, але й кінетичні, тому кількість клітин з високим ММП в них теж знижено відносно

сперматозоїдів чоловіків з нормозооспермією. Кріоконсервування може призвести до нових пошкоджень, що спричинить ще більше зниження морфофункіональних показників. Враховуючи це, важливим є оцінити ММП сперматозоїдів чоловіків з ОАТ перед та після кріоконсервування у захисних розчинах, які містять гліцерин та ПВП.

Після виділення рухливої фракції сперматозоїдів з еякуляту чоловіків з діагнозом ОАТ кількість клітин з високим ММП була (74,9 ± 3,8)%, що корелює з кількістю рухливих клітин (92,2 ± 8,8)%, r = 0,96, p<0,05) (Рис. 5.3).

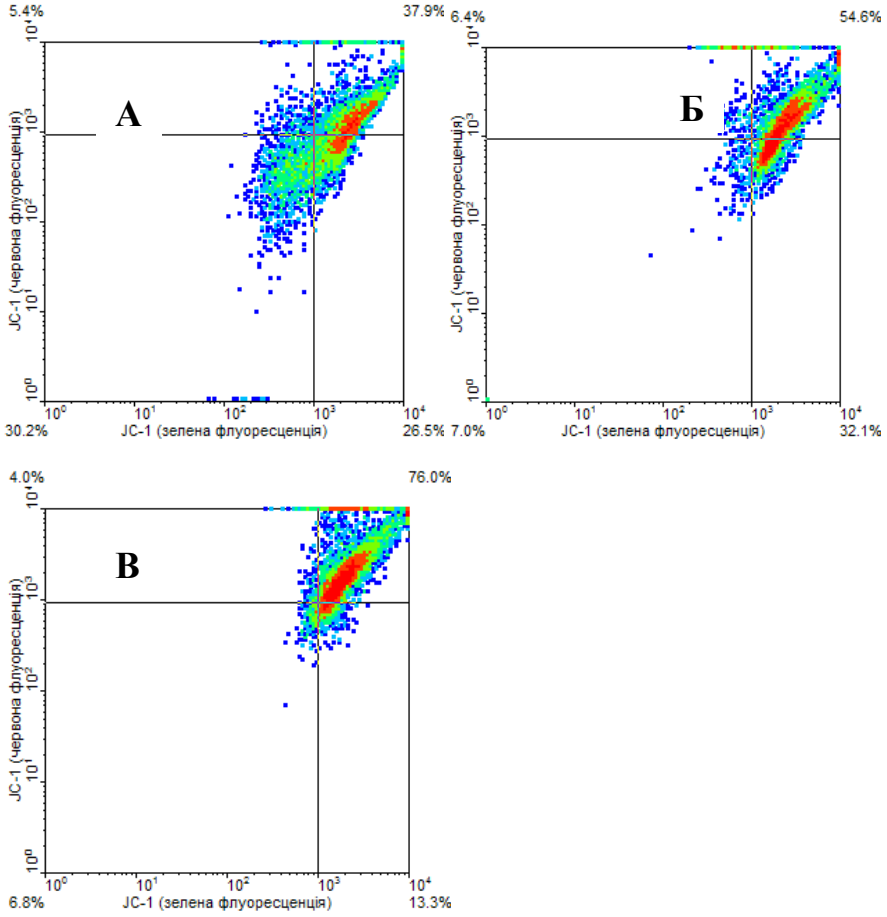



Рис. 5.3 Цитограми кріоконсервованої активної фракції сперматозоїдів, забарвлених JC-1, А – кріоконсервована рухлива фракція сперматозоїдів у середовищі з гліцерином (група I); Б – кріоконсервована рухлива фракція сперматозоїдів у середовищі з ПВП (група II); В – свіжовиділена рухлива фракція сперматозоїдів (група III).

Враховуючи те, що кріозахисні розчини, які містять гліцерин та ПВП, мають високу в'язкість, при вивчені рухливості сперматозоїдів рівень показників може бути знижений, тоді як вивчення ММП сперматозоїдів у розчинах може виявити їх функціональну активність.

Встановлено, що після кріоконсервування сперматозоїдів досліджувальних груп кількість клітин з високим ММП становила 34,7 ±4,2 та (54,5 ±4,2)% для груп I та II відповідно (рис. 5.4).

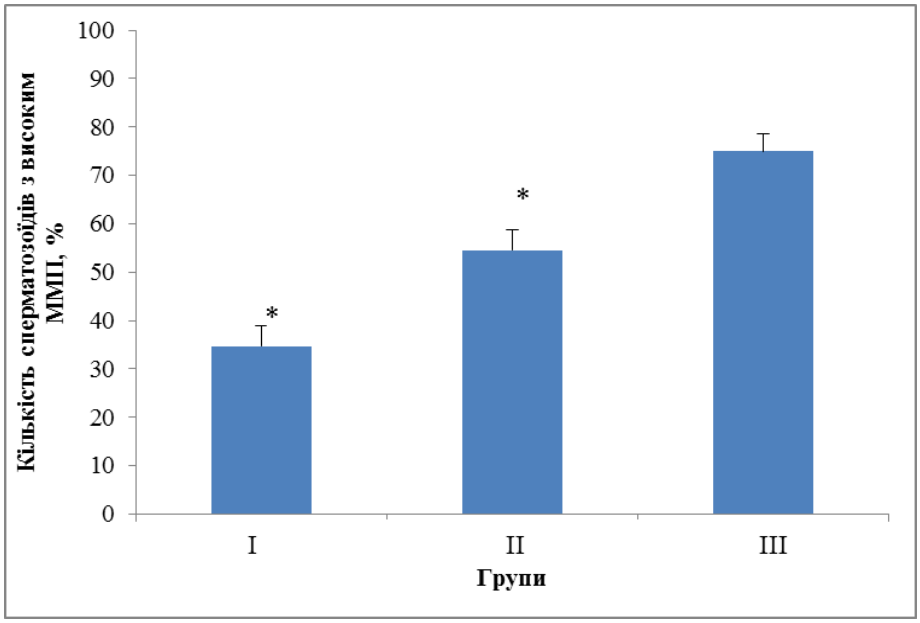



Рис. 5.4 Вплив кріоконсервування сперматозоїдів на кількість клітин з високим мітохондріальним мембранним потенціалом: * – відмінності значущі від групи III, p<0,01.

Таким чином, при кріоконсервуванні сперматозоїдів з ПВП зберігається хоча і значущо більша кількість клітин з високим ММП, а ніж після кріоконсервування з гліцерином, але менша, ніж у контрольних зразках. Це можна пояснити негативним впливом кріоконсервування на функціональну активність клітин після відтавання. Однак, необхідно зазначити, що використання ПВП як кріопротектор призводить до

збереження значущо більшої кількості сперматозоїдів у чоловіків з ОАТ, ніж рутинний метод заморожування з гліцерином ($p<0,01$).

Матеріали розділу 5 опубліковані в роботах [10, 26, 27, 32-34, 37].

# РОЗДІЛ 6. КЛІНІЧНІ ТА ЕМБРІОЛОГІЧНІ ПАРАМЕТРИ ЦИКЛІВ ЛІКУВАННЯ БЕЗПЛІДДЯ МЕТОДОМ ICSI З ВИКОРИСТАННЯМ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ СПЕРМАТОЗОЇДІВ

Взаємодія між сперматозоїдами і *Zona pellucida* (*ZP*) є вирішальним етапом при запліднені. Для проникнення в ооцит сперматозоїдові необхідно досягти його короно-кумулюсного комплексу, пройти крізь гіалуронову матрицю кумулюса і пенетрувати з ZP, яка є глікопротеїновим шаром, що оточує жіночу гамету. Під час знаходження в жіночому статевому тракті, сперматозоїди піддаються серії біохімічних і функціональних змін, які індукують екстремальний екзоцитоз. Запліднення відбувається завдяки акросомальній реакції, при якій ферменти, що вивільняються з голівки сперматозоїду, пом’якшують ZP [153]. Кількість сперматозоїдів, їх морфологічні характеристики, рухливість і життєздатність не визначають їх запліднюючої здатності [154]. Тест на зв’язування з ZP має абсолютну прогностичну цінність, оскільки дозволяє оцінити потенціал фертильності сперматозоїдів.

Метою наступного етапу дослідження став аналіз пенетраційної активності нативних і кріоконсервованих сперматозоїдів при нормо- і ОАТ.

Середня кількість сперматозоїдів в нативному еякуляті склала (12,4 ± 3,6) млн / мл . Фракція активнорухливих сперматозоїдів – (8,2 ± 1,1)%.

Ми виявили істотні відмінності в здатності сперматозоїдів досліджуваних груп пенетретувати ZP (табл.6.1).

*Таблиця 6.1*

Частота та індекс пенетрації *Zona pellucida* нативними та кріоконсервованими сперматозоїдами, (M ± m)

| Група | Частота пенетрації (%) | Індекс пенетрації (абс.) |
|---|---|---|
| I | 9,9±3,3* | 0,03±0,06* |
| II | 16,5±1,3 | 0,12±0,02 |
| III | 17,9±4,5 | 0,17±0,07 |

Примітка. * – різниця значуща порівняно з відповідним показником групи II та III (p <0,016).

Частота пенетрації *ZP* нативними сперматозоїдів склала (17,9 ± 4,5) (Рис.6.1). Після кріоконсервування частота пенетрації сперматозоїдів значущо знизилася до 9,9±3,3 та (16,5±1,3)% для груп I та II відповідно (p <0,016).

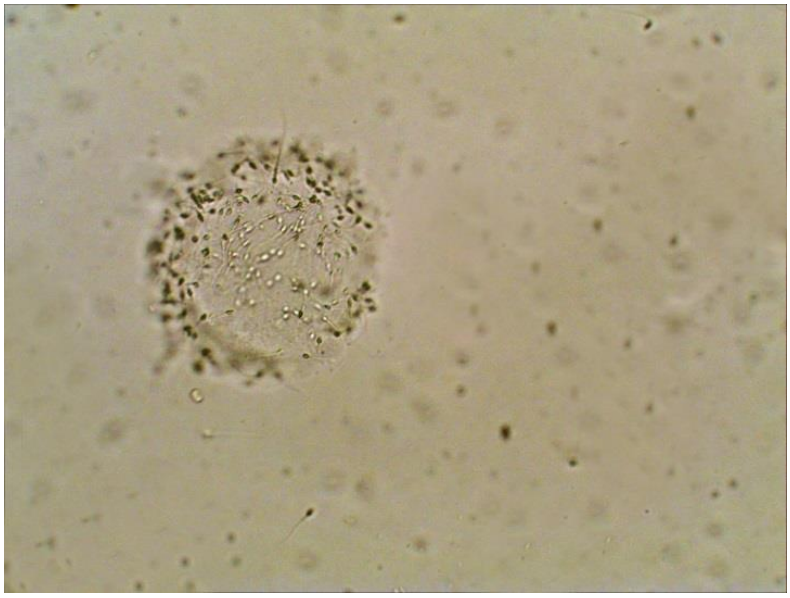


Рис. 6.1 Пенетрація сперматозоїдами *Zona pellucida*. Нативний препарат. Світлова мікроскопія, x400.

Індекс пенетрації в нативному зразку склав (0,17 ± 0,07)%. Після кріоконсервування індекс пенетрації *ZP* знизився до 0,03 ± 0,06 та (0,12±0,02)% для груп I-II відповідно (p <0,016).

Тест на пенетрацію з *Zona pellucida* може бути використаний як предиктор запліднюючої здатності нативних і кріоконсервованих сперматозоїдів людини.

Оскільки першим етапом запліднення є зв'язування сперматозоїда з ZP, то отримані нами дані можуть бути використані як предиктор запліднюючої здатності нативних і кріоконсервованих сперматозоїдів людини.

Не дивлячись на те, що метод ICSI дозволяє обійти проблеми із запліднюючою здатністю сперматозоїдів, вплив кріоконсервування на якість та розвиток ембріонів, отриманих після запліднення ооцитів сперматозоїдами, які були кріоконсервовані з ПВП, не з'ясовано. Проте кілька асоційованих із сперматозоїдами факторів можуть негативно впливати на морфокінетичні характеристики ембріонів [130]. Крім індивідуальних морфофункціональних характеристик сперматозоїдів на якість ембріонів можуть впливати і ступінь зрілості та якість ооцитів. На сьогоднішній день в літературі описано багато досліджень, які були зосереджені на вивченні впливу морфологічних характеристик ооцитів на якість ембріонів [155]. Особливо це стосується дисморфізму ендо- та екзоцитоплазматичних структур ооцитів [156].

Ретроспективно було проаналізовано результати ембріологічних протоколів, в яких ооцити запліднювали сперматозоїдами після кріоконсервування з 10% гліцерином (група I), 10% ПВП (група II) та нативними клітинами (група III).

Вік жінок є важливим прогностичним фактором в ефективності ДРТ, тому ми враховували цей фактор при рандомізації досліджуваних груп. Розподіл груп за віком жінок було наступним: група I – 31,1 ± 3,2; група II – 30,4 ± 3,9, група III – (33,6 ± 3,0) роки.

При аспірації фолікулів було виділено 230 ооцитів в групі I, 126 – в групі II, та 277 в групі III. Відмінності середньої кількості аспірованих і зрілих ооцитів, які перебували на стадії MII мітозу в досліджувальних групах не були значущими (Табл. 6.2).

Таким чином, групи були рандомізовані за такими показниками, як вік пацієнток, середня кількість ооцитів на пацієнтку та середня кількість ооцитів на стадії метафаза II.

*Таблиця 6.2*

Клінічні характеристики циклів лікування безпліддя методами ДРТ з використанням нативних і кріоконсервованих сперматозоїдів

| Параметр | Група, кількість пацієнтів | | |
|---|---|---|---|
| | I (n=32) | II (n=17) | III (n=39) |
| Вік пацієнток, роки | 31,1 ± 3,2 | 30,4 ± 3,9 | 33,6±3,0 |
| Середня (загальна) кількість ооцитів, M±m | 7,2±1,3 | 7,4±1,2 | 7,1±1,3 |
| Середня (загальна) кількість ооцитів на стадії M II, M±m | 6,5±1,2 | 6,3±1,3 | 6,0±1,2 |

Ретроспективний аналіз ембріологічних показників програми ДРТ із використанням кріоконсервованих сперматозоїдів дозволяв з’ясувати, що частота запліднення в групі I становила 82,2 ± 6,2, в групі II – 94,4 ± 7,8, при застосуванні нативних сперматозоїдів – (97,0 ± 6,6)% (Табл.6.3).

Морфокінетичний аналіз ембріонів виявив, що запліднення ооцитів сперматозоїдами, кріоконсервованими повільно з 10% гліцерином призводить до зупинки розвитку на стадії 8-бластомерів більше 30%

ембріонів. Такі ембріони характеризувались підвищеним рівнем фрагментації бластомерів, яка в окремих випадках сягала 100%.

Частота блоку розвитку ембріонів на стадії 8-ми бластомерів у ембріонах групи II відповідала морфокінетичній картині групи III.

*Таблиця 6.3*

Ембріологічні характеристики циклів лікування безпліддя методами ДРТ з використанням нативних і кріоконсервованих сперматозоїдів

| Параметр | Групи | | |
|---|---|---|---|
| | I | II | III |
| Частота запліднення, % | 82,2± 6,2 | 94,4 ± 7,8 | 97,0 ± 6,6 |
| Частота формування 8-клітинної стадії, % | 69,5 ± 5,1* | 90,0 ± 4,6 | 87,6±5,2 |
| Частота формування бластоцист, % | 30,9 ± 3,3* | 45,4±4,1 | 52,4±5,2 |

Примітка. * – відмінність значуща, порівняно з групою III, $p<0,01$

Частота формування бластоцист в групі I була значущо нижчою (30,9 ± 3,3), у порівнянні з даним показником для груп II (45,4 ± 4,1) та III (52,4 ± 5,2)%, ($p <0,001$). Розвиток до стадії бластоцисти (рис. 6.3) свідчить про високі якісні характеристики ембріонів.

Наші результати показали, що кріоконсервування сперматозоїдів з гліцерином не впливає на ранній розвиток ембріонів, проте значущо збільшує кількість ембріонів, які зупинили свій розвиток на стадії 8 – бластомерів.

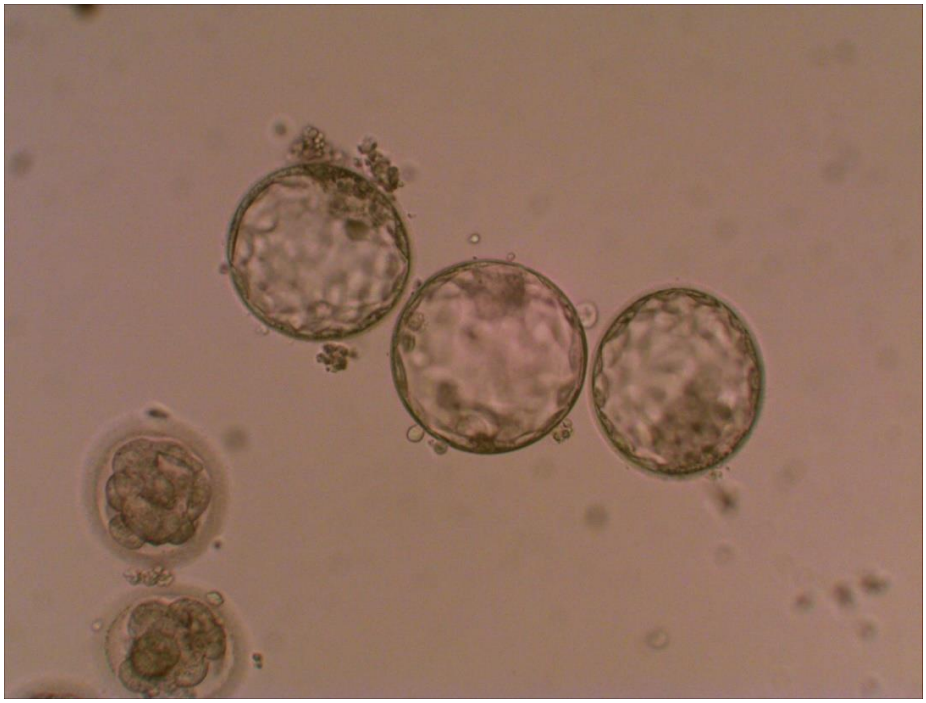


Рис. 6.2. Передімплантаційні ембріони на стадії бластоцисти, культивовані *in vitro*.

Таким чином, використання ПВП у якості кріопротектору є ефективним способом для отримання не тільки високого показника життєздатності сперматозоїдів, але й забезпечує їх високу запліднювальну здатність та не впливає на морфофункціональні параметри розвитку ембріонів *in vitro*.

Матеріали розділу 6 опубліковані в роботах [13, 18, 19, 29, 35].

# АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дисертаційна робота присвячена вивченню морфофункціональних та ультраструктурних характеристик сперматозоїдів людини, кріоконсервованих методом двоетапного охолодження з 10% розчином ПВП. Вивчення даного питання обумовлено збільшенням чоловічого фактору у структурі безпліддя та нагальною потребою збереження сперматозоїдів у чоловіків з ОАТ, які проходять лікування методами ДРТ.

Метод заморожування з гліцерином, який прийнято за «золотий стандарт» кріоконсервування сперматозоїдів людини при нормозооспермії є досить високоефективним і дозволяє забезпечити 70% частоти життєздатності сперматозоїдів після розморожування [8]. Проте відомо, що гліцерин є осмотично активним і повільно проникає крізь мембрану, що може призводити до об’ємних змін клітин, як внаслідок додавання вказаного кріопротектору, так і внаслідок втрати води під час циклу заморожування-відтавання [157]. Крім того, виведення цього кріопротектору з клітин вимагає етапу центрифугування, який є руйнівним для клітин, знижує кількість сперматозоїдів у зразку, викликає збільшення перекисного окислення ліпідів, що має принципове значення при роботі з статевими клітинами, отриманими з еякулятів чоловіків з діагнозом ОАТ.

Низькомолекулярні сполуки такі, як гліцерин взаємодіють гідрофобно з внутрішньоклітинними білками, тим самим порушують цитоскелетну архітектуру заморожених клітин, зменшують цілісність їх мембран та впливають на їх функціональні характеристики [158].

У нашій роботі показано, що метод повільного заморожування з гліцерином є малоефективним при роботі з еякулятами чоловіків з діагнозом ОАТ.

Гіпотеза ефективності сахарози в якості кріозахисної речовини була висунута В. Ісаченко та співавт., які повідомили про значне збільшення

прогресивної моторики та життєздатності кріоконсервованих клітин при додаванні до розчину сахарози сироводткового альбуміну людини [81].

Відомо, що сперматозоїди людини містять велику кількість білків, цукрів та інших компонентів, які роблять внутрішньоклітинний матрикс в'язким і який, сам по собі, може діяти як природний кріопротектор. Оскільки сперматозоїди людини осмотично стійки, ми припустили, що їх можна кріоконсервувати за відсутності проникальних кріопротекторів, використовуючи непроникний полімер ПВП.

Наш вибір на користь ПВП був обумовлений позитивними результатами, отриманими при кріоконсервуванні деяких видів клітин: лімфоцитів периферичної крові, кліток кісткового мозку експериментальних тварин та інших біологічних об'єктів [159, 160]. Було встановлено, що ПВП, середня молекулярна маса якого становить 10 000 Да, забезпечує найбільший ступінь захисту тромбоцитів при кріоконсервуванні [161].

Крім того, ПВП молекулярною масою 360 000 широко використовується в ембріологічному етапі ДРТ для імобілізації сперматозоїдів. Також використання ПВП не вимагає його видалення, тому запліднення ооцитів методом ICSI можна виконувати одразу після відтавання.

Раніше було показано, що стовбурові клітини, отримані з жирової тканини людини, можуть бути кріоконсервовані з використанням ПВП [69]. Зустрічаються поодинокі повідомлення щодо кріоконсервування ембріонів миші під захистом ПВП [162]. Показано, що ПВП є хорошою альтернативою іншим кріопротектор, оскільки дозволяє отримати високі показники виживаності сперматозоїдів птахів [163].

Оскільки в літературі відсутні дані щодо морфофункціональних характеристик сперматозоїдів після кріоконсервування з ПВП нами були оцінені кінетичні характеристики сперматозоїдів; рівень їх життєздатності; морфологічні та ультраструктурні характеристики, частота фрагментації

ДНК, рівень мітохондріального потенціалу, індекс зв'язування із *ZP*, частота запліднення та морфокінетичні характеристики отриманих передімплантаційних ембріонів.

При виділенні фракції рухливих клітин ми застосовували центрифугування в градієнті щільності та метод спливання. При цьому, не дивлячись на те, що у роботі використовували еякуляти чоловіків з ОАТ, частка морфологічно нормальних сперматозоїдів, а також клітин з легкою формою патології підвищувалася. Частота морфологічно нормальних сперматозоїдів збільшувалася в середньому в 2,3 рази, граничних – в 1,6 рази, а сумарна частка нормальних та граничних форм – в 2 рази. Це свідчить про високу ефективність видалення з популяції клітин з аномальною морфологією при виділенні активнорухливої та рухливої фракції. Раніше було показано, що при фракціонуванні еякуляту в градієнті щільності відбувається зменшення частки сперматозоїдів зі змінами форми і розміру ядра, акросоми, з аномаліями голівки, шийки та хвоста [164]. Дані про зміну частки клітин з аномаліями хвоста досить суперечливі.

У роботі В. Подуфалий показано, що кількість рухливих сперматозоїдів після їх кріоконсервування з гліцерином значущо знижується [165]. Важливість цього показника полягає у тому, що він є предиктором запліднювальної здатності сперматозоїдів [166]. Проте використання ПВП, який сам по собі має підвищену в'язкість, не дозволяє нам вилучити чинник сповільнення руху сперматозоїдів, тому кінетичні характеристики сперматозоїдів були визначені шляхом вивчення функції їх мітохондріального апарату.

Інші параметри, які можуть змінюватися під впливом факторів кріоконсервування є морфологічні характеристики, оскільки неконтрольований приплив позаклітинної рідини в сперматозоїди може змінювати клітинну осмоляльність і деформувати структуру мембрани, отже, змінюючи морфологічні характеристики сперматозоїдів [167].

M. Le та співавт. продемонстрували, що заморожування повільним та швидким способом призводило до вищої моторики та життєздатності, тоді як вітрифіковані сперматозоїди мали кращі морфофункціональні характеристики, а саме меншу кількість дефектів голівки, середнього відділу та хвоста [109].

Аналіз сперматозоїдів методом світлової мікроскопії дозволив виявити значущу різницю в наявності вакуолізації голівок сперматозоїдів після кріоконсервування з гліцерином.

Аналіз еякуляту, згідно з рекомендаціями ВООЗ, характеризує концентрацію, рухливість і морфологічні характеристики клітин [168]. Сперматозоїди із вакуолями відносять до категорії клітин з аномальною морфологією, окремо не виділяючи дану патологію [169]. Наразі класифікація вакуолей за їх розташуванням, кількістю та розмірами чітко не визначені. Виключенням є великі вакуолі: зазначено, що вони займають більше 4% від загальної площини голівки [170–172]. Механізм виникнення вакуолей полягає в утворенні мембранних бульбашок, внаслідок відділення частини ендоплазматичного ретикулуму та комплексу Гольджі. Деякі дослідники вважають, що вакуолі виникають всередині ядра, інші вважають, що вони мають акросомальне походження [173–177]. Вважають, що сперматозоїди, які не містять вакуолей, мають частоту фрагментації ДНК, яка є нижчою у порівнянні з тими, які містять вакуолі [178]. Показана кореляція між порушеннями конденсації хроматину та його дезорганізацією з вакуолізацією [179, 180]. За думкою A. Agarwal зі співавт. вакуолі є наслідком порушення упаковки хроматину і фрагментації ДНК [181]. Останнє явище може бути пов'язаним з апоптозом, оскільки в сперматозоїдах людини виявляють апоптотичні маркери: екстерналізація фосфатидилсерину та каспаз 3 [182, 183]. У пацієнтів з нормозооспермією відсутність вакуолей в клітинах корелює з наявністю нефрагментованою ДНК [184]. Було описано значне збільшення вакуолізації сперматозоїдів після кріоконсервування методом вітрифікації

[108] та її відсутність після кріоконсервування повільним методом [105]. Протилежні результати отримала група вчених, на чолі з F. Biotrelle, які експериментально показали зниження кількості рухливих сперматозоїдів і індукцію вакуолізації після повільного заморожування [106]. Негативний ефект гліцерину при використанні даного методу кріоконсервування швидше за все пов'язаний з тим, що не забезпечується термодинамічна рівновага між зовнішнім та внутрішньоклітинним середовищем, при цьому частина внутрішньоклітинної води не встигає покинути клітину. В результаті в ній виникають кристали льоду, які можуть викликати пошкодження органел і, як наслідок, відшаровування їх дрібних компартментів та вакуолізацію. Застосування непроникного кріопротектору, імовірно, призводить до достатньої регідратації клітин, тим самим знижує пошкодження внутрішньоклітинними кристалами льоду, які викликають вакуолізацію.

Ультраструктурний аналіз сперматозоїдів було проведено на основі того, що раніше було зроблено припущення, що ПВП індукує акросомальну реакцію і може викликати субмікроскопічні зміни структури сперматозоїдів [74].

Дослідження органел, таких як клітинні мембрани, акросома, мітохондрії та центріоль, потребують більшого збільшення та/або спеціальних методів фарбування [185]. З цією метою ми використовували передові методи візуалізації клітин, включно електронну мікроскопію, для виявлення впливу факторів кріоконсервування, особливо ПВП на ультраструктуру клітин.

Найбільш типовими змінами у кріоконсервованих з гліцерином сперматозоїдах було виникнення однієї великої, або декількох маленьких вакуолей.

Вважається, що вакуолі сперматозоїдів та незрілість хроматину пов’язані з потенціалом фертильності сперматозоїдів [186]. Крім того, існує зв’язок між фрагментацією ДНК  та наявністю у сперматозоїдах

великих вакуолей. Виділення рухомих, морфологічно нормальних сперматозоїдів без вакуолей призводило до більш високих показників імплантації та вагітності, а також нижчих показників викидня, порівняно з використанням нативних сперматозоїдів при нормозооспермії [187, 188].

Було оцінено взаємозв’язки між наявністю вакуолізації в сперматозоїдах, параметрами якості сперматозоїда, пошкодженням ДНК та народженням живих дітей [189]. Присутність вакуолей у голівках сперматозоїда було виявлено методом світлової мікроскопії при збільшенні в 6300 разів. Для дослідження пошкодження ДНК було використано метод вивчення фрагментації ДНК. Авторами було показано, що концентрація сперматозоїда була позитивно корельованою ($r = 0,088$; $p = 0,01$), а деконденсація хроматину – негативно ($r = – 0,102$; $p = 0,003$) з віком. Наявність вакуолей у голівці сперматозоїдів не було пов'язано з рештою морфологічних характеристик, їх рухливістю, фрагментацією ДНК та частотою народження дітей. Враховуючи частоту виникнення вакуолей від аномалій голівки (нормальна / аномальна) та вакуолі (наявність / відсутність), значущих варіацій виникнення вакуолей у нормальній чи аномальній головці не виявлено. Автори роблять висновок про те, що вакуолі – це фізіологічні особливості, які не змінюють функціональність сперматозоїдів [189].

Проте в нашому дослідженні вакуолізація голівки сперматозоїда після кріоконсервування з гліцерином зустрічалася значущо частіше, ніж після кріоконсервування методом двоетапного охолодження з ПВП. Більш того, саме в групі кріоконсервування з гліцерином значущо частіше реєструвався блок розвитку ембріонів на стадії 8-бластомерів та зниження частоти розвитку до стадії бластоцисти.

Крім вакуолізації голівки ми виділяли часткове набухання (розпушення), а в деяких випадках і відшарування акросомального чехлика.

Після кріоконсервування саме з гліцерином ми виділяли наступні зміни в області голівки: I – розпушення акросомального чехлика і часткове відшарування його від голівки; 2 – зморщування, утворення складчастості в області акросомального чехлика; 3 – сильне набухання і перфорація (везикуляція); 4 – повне його відшарування; 5 – оголення голівки – відсутність акросомального чехлика.

Заморожування-відтавання викликає ряд структурних змін сперматозоїдів. Оболонка в більшості випадків сильно відшаровується і частково фрагментується. Перинуклеарний простір звужується. У ньому утворюються електроннопрозорі «розриви». Ядро зберігає таку ж структуру, як і нативні сперматозоїди.

Важливість вивчення ультраструктури сперматозоїдів після кріоконсервування є актуальним, оскільки важливі органели сперматозоїда (акросома, мітохондрії, центріоль, ядро) є дуже чутливими до впливу низьких температур [190–192] і ми приділяли їм особливу увагу в цьому дослідженні.

Звернув на себе увагу факт, що спіралі мітохондріального тіла на відміну від норми, розташовуються пухко, між ними виявляються великі відстані, співмірні з шириною мітохондрій. Відбувається часткове руйнування окремих мітохондрій, або істотне розбухання всієї структури.

Крім того, сперматозоїди характеризуються вираженими дефектами аксонемальних та центріолярних ділянок. Важливим є те, що аномалії центріолі, успадковані ембріоном, можуть призвести до хромосомних та ядерних аберацій та аномального розвитку [193].

При дослідженні ультраструктури сперматозоїдів після кріоконсервування спостерігається різко виражені відшарування акросомальної зони чехлика, злами в області шийки і деформації в хвостовому відділі.

Таким чином, кріоконсервування може викликати ряд структурних змін, які, в свою чергу, можуть призвести до втрати функціональної повноцінності сперматозоїдів.

Сучасні морфофункціональні методи оцінки сперматозоїдів не дають коректного прогнозу результатів запліднення, а отже, опираючись тільки на результати кінетичного потенціалу чоловічих клітин та їх морфологічних характеристик неможливо оцінити їх репродуктивний потенціал.

Важливість таких фізіологічних параметрів, як конденсація, реакція акросоми та цілісність цитоплазматичної та мітохондріальної мембрани при заплідненні добре відомі [194]. Оскільки ці структури дуже чутливі до холоду, ми приділяли їм особливу увагу в нашому дослідженні. Серед факторів, пов’язаних із результатами запліднення, найбільше значення має стан ДНК.

Зв’язок порушень організації генетичного матеріалу чоловічих статевих клітин із безпліддям представляє загальнобіологічну та важливу медичну проблему. Вибракування сперматозоїдів із відхиленнями в організації генетичного матеріалу могло б грати роль фільтру, який виключає серйозні аномалії розвитку. З іншого боку, важливо виявити випадки чоловічого безпліддя, зумовлені не тільки зміною морфології, кінетичних та функціональних характеристик, але й з відхиленнями в організації їх генетичного матеріалу. Оскільки в нормі ДНК повинна мати певну конформацію, хімічну і фізичну структуру, то будь-яке незначне пошкодження ДНК або її упаковки може привести до неправильного розвитку подій після проникнення такого дефектного сперматозоїда в яйцеклітину [195].

Зміни в структурі ДНК були вивчені багатьма групами після кріоконсервування, і повідомлялося про суперечливі результати. Деякі автори повідомили про руйнування ДНК, інші  про те, що такі зміни відбуваються лише у чоловіків зі зниженою фертильністю [196]. Більше

того, групою дослідників на чолі з Hammadeh та ін. було виявлено, що повільне заморожування дозволяє отримати високі показники збереження ДНК на відміну від інших способів кріоконсервування [197].

Раніше нами було показано збільшення фрагментації ДНК в кріоконсервованих сперматозоїдах людини [151]. Оскільки в своїй роботі ми не виявили факту збільшення фрагментації ДНК, можна стверджувати, що ПВП є безпечним для геному сперматозоїдів. Патофізіологічні механізми, які ведуть до фрагментації ДНК, не цілком ясні. Передбачається, що їх причиною можуть бути нерепаровані пошкодження ДНК, дефекти ремоделінг хроматину, які виникають в ході сперматогенезу, окислювальні процеси та апоптоз [198].

Механізми, які беруть участь в етіології фрагментації ДНК, а також причина кріоушкоджень ДНК на разі не з’ясовані. Встановлення механізмів виникнення фрагментації ДНК потребують подальшого вивчення для забезпечення ефективного кріоконсервування чоловічих статевих клітин, високих показників ДРТ та запобігання народження дитини з вродженими вадами розвитку.

Ушкодження ДНК сперматозоїдів може бути пов’язане з таким етапом кріоконсервування, як відтавання. За даними Gosalvez J. та співавт. найвищий рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів спостерігається протягом перших чотирьох годин після відтавання [199]. Автори вважають, що сперматозоїди необхідно нагріти перед проведенням ICSI, максимально скоротивши час між нагріввнням та запліднення.

Було показано, що ПВП може зменшувати частоту запліднення та пригнічувати ембріональний розвиток, оскільки молекулярна маса ПВП, що використовується становить 360 000 і його введення в ооцит при ICSI може перешкоджати розвитку ембріона [200].

В наших дослідженнях ми не виявили факту збільшення 8-ми клітинного блоку у ембріонах, отриманих після запліднення ооцитів

сперматозоїдами, кріоконсервованих з ПВП на відміну від ембріонів, запліднених із використанням гліцерину.

Таким чином, встановлено, що кріоконсервування сперматозоїдів людини за двоетапною програмою охолодження з ПВП дозволяє зберегти їх життєздатність та ультраструктурну цілісність. Вивчення ультраструктурних відхилень сперматозоїдів при астенозооспермії дозволяє врахувати це при виборі оптимального методу їх кріоконсервування.

Для визначення мітохондріальної активності ми використовували зонд JC-1, який зазвичай використовується для раннього виявлення клітинного апоптозу. Однак у зрілих еякуляторних сперматозоїдах апоптозу не відбувається [201], оскільки у них відсутня необхідна збірка ферментів та сигнальних шляхів, які необхідні клітині для проходження цього процесу і відсутність оранжево-червоної флуоресценції через зв’язування катіонного зонда мітохондріями сперматозоїдів передбачає лише втрату енергозберігаючої здатності.

Сперматозоїд людини повністю оточений мембраною, яка захищає ультраструктурні одиниці клітини, зокрема акросому, мітохондрії, центріоль. Для компетенції клітини після впливу факторів кріоконсервування мембрана повинна залишитися неушкодженою та зберегти свою функцію. Енергія необхідна не тільки для руху сперматозоїдів, але й для запліднення. Вона постачається у формі АТФ, синтезованого або гліколізом цитоплазми, або окислювальним фосфорилюванням в мітохондріях [202]. Відносний внесок цих двох процесів у генерування АТФ поки що незрозумілий. Однак АТФ, яка генерується у внутрішній мітохондріальній мембрані, переноситься до мікротрубочок, завдяки чому сперматозоїдів набуває рухливості [203]. Отже, зниження рухливості сперматозоїда може бути пов'язане з ураженням мітохондрій.

У нашому дослідженні ступінь пошкодження плазматичних мембран, була майже ідентичною зменшенню кількості сперматозоїда з функціональними мітохондріями.

Раніше було продемонстровано, що мітохондріальна активність та життєздатність однаково чутливі до пошкоджень, спричинених кріоконсервуванням [204]. Деякі автори припускають, що в даний час методи кріоконсервування сперматозоїда людини є ефективними для збереження всіх цих структур [205]. Проте в літературі не приведено жодного повідомлення про кріоконсервування сперматозоїдів з ПВП та вплив вказаного кріопротектору на мітохондріальний потенціал клітини. Оскільки ПВП сам по собі є дуже в’язким, саме через цю властивість його широко використовують в ДРТ для іммобілізації сперматозоїдів. Тому важливим було оцінити значення мітохондріального потенціалу після впливу факторів кріоконсервування з використанням ПВП.

Ми показали, що включення ПВП у кріозахисне середовище має видимий кріозахисний вплив на цілісність мітохондріальної мембрани та забезпечує значний захист клітин.

В ході виконання експериментальної частини роботи нами було показано, що після виділення рухливої фракції сперматозоїдів кількість клітин з високим ММП становила (74,9 ± 3,8)%. Для суспензії нативних клітин цей показник корелював із кількістю рухливих клітин (92,2 ± 8,8)%, $r = 0,96$, $p<0,05$.

Для кріоконсервованих клітин цей показник був знижений, оскільки кріозахисні розчини, які містять гліцерин та ПВП, мають більш високу в’язкість.

Нами було встановлено, що після кріоконсервування сперматозоїдів досліджувальних груп кількість клітин з високим ММП знижувалася до 34,7 ±4,2 та (54,5 ±4,2)%, тобто майже в 3 рази для сперматозоїдів, кріоконсервованих в гліцерині та у 2 рази для сперматозоїдів, кріоконсервованих у ПВП. Це можна пояснити негативним впливом

кріоконсервування на функціональну активність клітин після відтавання. Водночас необхідно зазначити, що ПВП виступає як кріопротектор, використання якого призводить до збереження значно вищої кількості сперматозоїдів у чоловіків з ОАТ, ніж загальновживаний метод заморожування з гліцерином.

Значення мітохондріального потенціалу є важливим не тільки для оцінки рухливості сперматозоїдів, але й для визначення їх запліднювальної здатності. Виходячи з цього, ми проаналізували показники зв'язування нативними та кріоконсервованими сперматозоїдами із *ZP*.

В нашому дослідженні було продемонстровано, що показник зв'язування з *ZP* сперматозоїдів, кріоконсервованих з гліцерином був значущо нижче, ніж при використанні ПВП. R. Jeyendran зробив висновок, що видалення гліцерину з навколишнього середовища знижує їх рухливість та здатність сперматозоїдів до запліднення [206]. Автори роблять висновок про те, що гліцерин не є оптимальною кріозахисною речовиною.

При ОАТ та важкій тератозооспермії спостерігається висока (> 70%) частота дефектної взаємодії сперматозоїдів і *ZP* [207].

Показано, що існує кореляція між кількістю сперматозоїдів, які зв'язуються з ZP з їх запліднюючої здатністю і якістю отриманих ембріонів [208]. Існують лише поодинокі публікації про успішне запліднення ооцитів, позбавлених *ZP*, методом ICSI [209].

Взаємодія сперматозоїда з *ZP* є ключовою сходинкою в заплідненні ооцитів людини. Відомо, що *ZP* містить три глікопротеїни: *ZP1, ZP2* і *ZP3*. Запліднення супроводжується злиттям периферичних кортикальних гранул з мембраною, яке призводить до виходу вмісту кортикальних гранул в перівителіновий простір. Цей екзоцитоз модифікує матрикс ZP, попереджаючи виникнення поліспермії [210].

Дані результати необхідно враховувати при виборі тактики запліднення коли використовуються кріоконсервовані сперматозоїди,

особливо в разі ОАТ, що підтверджується нещодавно опублікованими дослідженнями [211].

Нами виявлено, що ооцити, запліднені сперматозоїдами з високою моторикою та добре візуалізованою шийкою, стадії бластоцисти досягають у 60 % випадків. Прогресуюча моторика може бути показником адекватної метаболічної активності сперматозоїда.

Було встановлено, що морфологічні характеристики сперматозоїдів значно корелюють із розвитком та якістю бластоцисти. L. Robinson та спів. повідомили, що тератозооспермія не впливає на частоту бластуляції ембріонів *in vitro*. Проте недоліком експерименту було те, що запліднення ооцитів здійснювали осіменінням, а не ICSI. Оскільки *ZP* забезпечує селективний бар'єр для аномально сформованих сперматозоїдів припускають, що морфологія сперматозоїда який прийняв участь у заплідненні була нормальною [212]. При використанні ICSI, селективний бар'єр *ZP* усувається та замінюється рішенням ембріолога, який виконує ICSI. В нашому ретроспективному дослідженні було проведено запліднення ооцитів без ознак дисморфізму ендо- та екзоцитоплазматичних структур з введенням сперматозоїдів з морфологічно нормальною будовою.

Проте, використання для запліднення сперматозоїдів різних досліджувальних груп дозволило з'ясувати, що сперматозоїди, кріоконсервовані із гліцерином, мають найбільшу кількість морфологічних аномалій. Не дивлячись на морфологічну селекцію перед виконанням ICSI ми не можемо гарантувати ультраструктурну цілісність сперматозоїда. Аналіз темпів розвитку ембріонів *in vitro* показав, що ембріони, отримані після запліднення ооцитів сперматозоїдами, кріоконсервованими з гліцерином значущо частіше зупиняють свій розвиток на стадії 8-бластомерів.

Раніше було показано, що аберантна морфологія голівки сперматозоїда корелює зі значним збільшенням числових та структурних

хромосомних відхилень [213], що може пояснювати отримані нами результати. Більше того, культивування ембріонів до стадії бластоцисти дозволяє уникнути успадкування аномального батьківського геному після ICSI [214].

Здатність ембріонів до розвитку бластоцисти залежать не лише від батьківських факторів. ICSI та пов'язані з цим процедури самі по собі можуть негативно впливати на морфокінетичні характеристики ембріонів людини *in vitro* [215].

Чи може застосування ПВП в якості кріопротектору та його використання для іммобілізації сперматозоїдів під час ін'єкцій знизити рівень запліднення та зменшити якість ембріонів [216]?

У нашому дослідженні ICSI проводили при важкому безплідді у чоловіків, коли можливе невдале запліднення. Як результат, відносний внесок ICSI та батьківських факторів у розвиток бластоцисти неможливо встановити. Однак з наших даних випливає, що при проведенні ICSI для важкого чоловічого фактору потрібно очікувати меншу частоту утворення бластоцисти за рахунок збільшення ембріонів, які припиняють свій розвиток на третю добу розвитку.

Незважаючи на широке використання кріоконсервованих сперматозоїдів у ДРТ, було висловлено припущення, що процедура заморожування-відтавання може спричинити травмування клітин та зменшити частку функціональних клітин у зразку [217]. Найважливішим параметром, на який може вплинути заморожування сперматозоїда, є рухливість [218]. Незважаючи на те, що частота запліднення після ICSI вважається незалежною від основних параметрів еякуляту, більш новітні повідомлення припускають, що аномалії розвитку ембріонів можуть бути викликані батьківським геномом, так званим «батьківським ефектом» [219].

У публікаціях V.Isachenko [77] було успішно вітрифіковано сперматозоїди без використання кріопротекторів. Було продемонстровано

більш високу рухливість сперматозоїдів та їх здатність до запліднення *in vitro,* порівняно із сперматозоїдами, кріоконсервованими за допомогою звичайного повільного заморожування. Не було знайдено відмінностей у таких параметрах, як життєздатність, швидкість відновлення та відсоток морфологічно нормальних сперматозоїді між вітрифікованими та замороженими повільно сперматозоїдами. Було помічено, що кількість сперматозоїдів із ознаками акросомної реакції вірогідно відрізняються у порівнянні з нативними сперматозоїдами.

Раніше припускали, що кріоконсервування сперматозоїдів не впливає на конденсацію та реакцію акросоми [220]. Згідно з їх даними, реакція акросоми після кріоконсервації може включати деякі складні механізми, а не фізіологічні зміни, викликані конденсацією. Результати нашого дослідження відповідали даним цієї дослідницької групи [220], які показали значущу різницю між кількістю емітованих та реагуючих на акросому сперматозоїдів контрольних та експериментальних груп.

Для виявлення мітохондріальної компетентності ми використовували зонд JC-1, який зазвичай використовується для раннього виявлення початку клітинного апоптозу. Однак зрілі еякульовані сперматозоїди здорової людини не здатні перенести апоптоз [201], через відсутність необхідної збірки ферментів та сигнальних шляхів. Раніше було продемонстровано, що мітохондріальна активність та життєздатність однаково чутливі до пошкодження, спричиненого кріоконсервуванням [220]. Однак припускають, що індувідуалізовані методи людини дозволяють зберігати морфофункціональні характеристики всіх цих структур [222,223].

Ми показали, що включення ПВП у кріозахисне середовище позитивно впливає на цілісність мітохондріальної мембрани та забезпечило захист приблизно 65% сперматозоїдів порівняно з контролем ($P < 0,05$). У групі II лише у 33% сперматозоїдів виявили неушкоджені мітохондріальні мембрани.

Визначення фрагментації ДНК та значення мітохондріального потенціалу можуть бути розглянуті як необхідні етапи діагностики в рамках підготовки пацієнтів до програм ДРТ. Значення фрагментації ДНК, а також оцінка рівня їх мітохондріального потенціалу можуть мати прогностичну значимість при прогнозуванні імовірності запліднення ооцитів та морфокінетичних параметрів розвитку ембріонів *in vitro*.

Таким чином, важливою перевагою запропонованого нами методу кріоконсервування сперматозоїдів при ОАТ є те, що сперматозоїди можуть бути використані в програмі ДРТ без додаткової обробки, наприклад центрифугування та градієнту щільності. Відтаяні сперматозоїди можуть бути додані безпосередньо в середовище запліднення або одразу бути відібраними для запліднення. Запропонований нами метод має переваги для практичного застосування, оскільки навіть при низькій кількості сперматозоїдів у зразку можна успішно виконувати запліднення методом ICSI.

# ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі відповідно до поставленої мети і задач наведено нові дані щодо впливу кріоконсервування методом двоетапного охолодження з 10% ПВП в якості кріопротектору на морфофункціональні та ультраструктурні характеристики поодиноких сперматозоїдів людини при ОАТ.

1. Вперше показано, що використання 10% ПВП для кріоконсервування поодиноких сперматозоїдів чоловіків з вадами сперматогенезу дозволяє отримати високі показники їх рухливості та життєздатності: 41,4 ± 8,1 та (89,6 ± 8,6)%.

2. Встановлено, що кріоконсервування поодиноких сперматозоїдів методом двоетапного охолодження з гліцерином індукує вакуолізацію з утворенням переважно дрібних вакуолей. Застосування в якості кріопротектору 10% ПВП запобігає утворенню вакуолей.

3. Кількість ультраструктурних аномалій голівки, шийки, хвоста або їхніх ультраструктурних елементів склала 83,2 ± 8,1, 63,2 ± 5,1 та (60,7 ± 7,5)% при їх кріоконсервуванні з гліцерином, ПВП та свіжовиділеними клітинами, відповідно.

4. Частота фрагментації ДНК у сперматозоїдах, кріоконсервованих з ПВП, становить (23,1 ± 2,5)%, що відповідає рівню свіжовидиленої активнорухливої фракції ($p<0,01$). Кількість клітин з високим мітохондріальним потенціалом в сперматозоїдах після кріоконсервування з ПВП становить (54,5 ± 4,2)%, що значущо вище, ніж при використанні стандартного методу з гліцерином ($p <0,01$).

5. Встановлено, що частота запліднення ооцитів поодинокими сперматозоїдами, кріоконсервованими за двоетапним методом охолодження з 10% ПВП становить (94,4 ± 7,8)%, показник бластуляції отриманих ембріонів – (45,4 ± 4,1)%, що є на рівні застосування свіжовиділених клітин ($p<0,01$).

# СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ:


1. Sadeghi MR. The 40th Anniversary of IVF: Has ART's Success Reached Its Peak? J Reprod Infertil. 2018;19(2):67–8.
2. Петрушко МП. Сучасний стан проблеми кріоконсервації репродуктивних клітин та ембріонів людини. Вісник Нац Акад Наук Укр. 2017;(7):44–52. doi: https://doi.org/10.15407/visn2017.07.044
3. Huang C, Lei L, Wu HL, Gan RX, Yuan XB, Fan LQ, Zhu WB. Long-term cryostorage of semen in a human sperm bank does not affect clinical outcomes. Fertil Steril. 2019 Oct;112(4):663–9.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.06.008
4. Горпинченко ІІ, Романюк МГ. Чоловіче безпліддя: етіологія, патогенез, діагностика та сучасні методи лікування. Здоровье мужчины. 2016;1(56):8–17.
5. Yurchuk T, Petrushko M, Fuller B. Science of cryopreservation in reproductive medicine – Embryos and oocytes as exemplars. Early Hum Dev. 2018 Nov;126:6–9. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2018.08.016. Epub 2018 Sep 14. PMID: 30224180.
6. Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Dessole S, Nawroth F. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. Reprod Biomed Online. 2003;6(2):191–200. doi:10.1016/s1472-6483(10)61710-5.
7. Isachenko E, Isachenko V, Weiss JM, et al. Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. Reproduction. 2008;136(2):167–173. doi:10.1530/REP-07-0463.
8. Shah D, Rasappan, Shila, Gunasekaran K. A simple method of human sperm vitrification. MethodsX. 2019;6:2198–204. Published 2019 Sep 18. doi:10.1016/j.mex.2019.09.022.
9. Riva NS, Ruhlmann C, Iaizzo RS, Marcial López CA, Martínez AG. Comparative analysis between slow freezing and ultra-rapid freezing for

human sperm cryopreservation. JBRA Assist Reprod. 2018 Nov 1;22(4):331–7. doi: 10.5935/1518-0557.20180060. PMID: 30132630; PMCID: PMC6210620.

10. Волкова НО, Павлович ОВ, **Гапон АА.** Стан деконденсації хроматину в сперміях людини після кріоконсервування та впливу електро-магнітного випромінювання в мілімітровому діапазоні. Біофізичний вісник. 2013; 2:87–94.
11. Yurchuk T, Petrushko M, **Gapon A**, Piniaiev V, Kuleshova L. The impact of cryopreservation on the morphology of spermatozoa in men with oligoasthenoteratozoospermia. Cryobiology. 2021 Mar 2:S0011-2240(21)00059-6. doi: 10.1016/j.cryobiol.2021.02.009. Epub ahead of print. PMID: 33667435.
12. Павлович ОВ, Ревенко ОБ, **Гапон ГО.** Оптимізація режиму відтавання кріоконсервованої сперми людини при нормо- та патоспермії. Проблемы криобиологии и криомедицины.2016; 26(1):45–52.
13. Павлович ЕВ, Петрушко МП, Юрчук ТА, Пиняев ВИ, **Гапон АА.** Тест на пенетрацию с *Zona pellucida* как предиктор оплодотворяющей способности нативных и криоконсервированных сперматозоидов человека. Український журнал медицини, біології та спорту. 2017;1:189–92.
14. Павлович ОВ, **Гапон ГО**, Юрчук ТО, Петрушко МП. Кріоконсервування сперматозоїдів людини з проникаючими і непроникаючими кріопротекторами. Медицина сьогодні і завтра. 2019; 4(85):27–34.
15. Петрушко МП, Павлович ОВ, Пуговкін АЮ, Коваленко ІФ, **Гапон ГО**, Піняєв ВІ, Юрчук ТО. Індукція вакуолізації в сперматозоїдах чоловіків з олгіастенотератозооспермією після кріоконсервування з гліцерином і полівнілпіролідоном. Морфологія. 2020;14(3):148–53.

16. **Гапон ГО**, Павлович ОВ, Юрчук ТО, Піняєв ВІ, Петрушко МП. Кріоконсервування сперматозоїдів людини в ПВП і сахарози. Експериментальна і клінічна медицина. 2019;84(3):4–9.
17. Pavlovych O, **Hapon H**, Yurchuk T, Repin M, Marchenko L, Govorukha T, Petrushko M. Ultrastructural and Functional Characteristics of Human Spermatozoa After Cryopreservation by Vitrification. Probl Cryobiol Cryomed. 2020;30(1):24–33.
18. Петрушко МП, Пиняев ВИ, Юрчук ТА, Павлович ЕВ, **Гапон АА.** Выбор тактики оплодотворения ооцитов человека криоконсервированными сперматозоидами в программе лечения бесплодия вспомогательными репродуктивными технологиями. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Урологія, андрологія, нефрологія». 2016. С.152–4.
19. Петрушко МП, Панасовский НЛ, Аркатов АВ, Павлович ЕВ, Юрчук ТА, Пиняев ВИ, Гапон АА. Эмбриологические параметры циклов лечения бесплодия методами ВРТ с использованием криоконсервированных эпидидимальных сперматозоидов. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Урологія, андрологія, нефрологія». 2017. С.106–8.
20. Петрушко МП, Гапон ГО, Юрчук ТО. Кріоконсервування сперматозоїдів людини при ОАТ. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Урологія, андрологія, нефрологія. Досягнення, проблеми, шляхи вирішення». Збірник наукових праць. Харків. 2019. С.147–8.
21. Патент України Патент № 144028. Україна, МПК A01N 1/02. Заявл.27.03.2020, з.н. u 2020 02082. Публ. 25.08.2020. Бюл. № 16. Петрушко МП, Юрчук ТО, **Гапон ГО**, Павлович ОВ. Спосіб кріоконсервування сперматозоїдів чоловіків з вадами сперматогенезу.

22.Волкова НА, Павлович ЕВ, Николов ОТ, Петрушко МП, Гапон АА. Влияние факторов криоконсервирования на морфофункциональные характеристики спермы человека. Тезисы докладов научной конференции «Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины». Харьков, 18–19 октября 2012. Проблемы криобиологии. 2012;22(3):363.

23.Павлович ЕВ, Петрушко МП, Юрчук ТА, Гапон АА, Пиняев ВИ. Криоконсервирование единичных сперматозоидов путем витрификации в микросоломинках. Матеріали науково-практичної конференції з участю міжнародних спеціалістів, присвяченої дню науки «Медична наука на перетині спеціальностей: сьогодення і майбутнє» 19 травня 2017 р. С.84.

24.**Gapon GO,** Petrushko MP, Yurchuk TO, Pavlovich OV, Piniaev VI. Survival of Human Spermatozoa After Cryopreservation with No-Wash Procedure. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2018;28(2):171.

25.**Hapon HO,** Pavlovich OV, Yurchuk TO, Repin MV, Marchenko LM. Ultrastructural Characteristics of Human Sperm After Cryopreservation with Polyvinylpiralidon by Vitrification. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2019; 29(2):178.

26.**Гапон ГО,** Петрушко МП, Юрчук ТО. Кореляційний зв’язок стану ДНК та кінетичних характеристик сперматозоїдів людини під впливом факторів кріоконсервування методом вітрифікації. Матеріали конференції «Актуальні питання сучасної медицини» 28-29 березня 2019р. С.67–68.

27.Петрушко МП, Павлович ОВ, Волкова НО, Пиняев ВИ, **Гапон АА**, Юрчук ТА. Апоптоз в нативных и криоконсервирвоанных сперматозоидах. Матеріали 5-го з’їзду клітинної біології з міжнародною участю. Одесса. 2-6 жовтня 2016. С. 12.

28.Павлович ОВ, Петрушко МП, Піняєв ВІ, **Гапон ГО**, Юрчук ТО. Morphological analysis of human spermatozoa at normozoospermia

before and after cryopreservation. Матеріали Науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології», м. Дніпро 5-7 жовтня 2016 р. Присвяченої 100-річчю дніпропетровської (Катеринославської) школи морфологів. С.27–28.

29. Гапон АА, Юрчук ТА, Петрушко МП, Павлович ЕВ, Пиняев ВИ. Пенетрационная активность нативных и криоконсервированных сперматозоидов человека. Матеріали міжнародної конференції «Холод в біології та медицині», Х., 2017, С.38.

30. Petrushko MP, Yurchuk TA, Gapon AA, Pavlovich EV, Pinyaev VI. Micro- and large volumes cryopreservation of single human spermatozoa using non-penetrating cryoprotectant. Society for Low Temperature Biology Annual Meeting 2018 6-7 September 2018, Crop Research Institute (Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.), Czech Republic. CryoLetters. 2019;40(5):257–74.

31. **Гапон ГО**, Петрушко МП, Юрчук ТО, Піняєв ВІ, Павлович ОВ. Вибір оптимального кріозахисного середовища для заморожування сперматозоїдів людини. Науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 25-річчю НАМНУ. К., 23 березня Журнал Національної Академії Медичних Наук України. Спецвипуск. 2018 р. С.108–109.

32. **Гапон ГО**, Петрушко МП, Юрчук ТО, Павлович ОВ, Піняєв ВІ. Вплив сім’яної плазми на кінетичні характеристики та стан ДНК кріоконсервованих сперматозоїдів людини. Матеріали XV Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» до 213-річчя зі дня заснування та 25-річчя зі дня відродження медичного факультету Харківського національного університету В.Н. Каразіна, 25-26 квітня 2018 року. С.61–63.

33. **Gapon G,** Yurchuk T, Pavlovich O, Petrushko M. DNA fragmentation of cryopreserved human sperm of men with pathospermia. Biopolimers and cell. 2019;35(5):399.

34. Pavlovich O, Piniaiev V, Yurchuk T. **Gapon G,** Petrushko M. Level of lipid peroxidation and antioxidant protection state in native and cryopreserved human spermatozoa. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу, м.Тернопіль, 30 вересня-4 жовтня 2019. С.122

35. **Гапон ГО,** Юрчук ТО, Петрушко МП. Оцінка морфологічних характеристик сперматозоїдів людини для вибору метода запліднення ооцитів у програмах ДРТ. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Актуальні проблеми морфології в теоретичній та практичній медицині». 24-25.10.19 м.Чернівці. С.44–6.

36. **Гапон ГО**, Павлович ОВ. Кріоконсервування сперматозоїдів людини з полівінілпіролідоном за олігоастенотератозооспермії. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2020;30(3):296.

37. **Гапон ГО**, Павлович ОВ, Юрчук ТО, Піняєв ВІ, Петрушко МП. Стан хроматину в сперматозоїдах людини після кріоконсервування. Матеріали четвертої всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» 4-6листопада 2020 р.; Дніпро. С.18.

38. **Гапон ГО**, Павлович ОВ, Юрчук ТО, Піняєв ВІ, Петрушко МП. Оцінка морфологічних параметрів сперматозоїдів, кріоконсервованих з ПВП. Матеріали XVII міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання сучасної медицини». Харків, 2020. С.72–3.

39. Petrushko MP, Pavlovich OV, Puhovkin AYu, Kovalenko IF, **Gapon GO**, Pinyaev VI, Yurchuk TO. Induction of vacuolizationin spermatozoa from men with oligoasthenoteratozoospermia after cryopreservation with glycerol and PVP матеріали четвертої всеукраїнської науково-

практичної конференції з міжнародноюучастю «Теорія та практика сучасної морфології» 4-6листопада 2020 р; Дніпро, Україна с. 87–8.

40. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. Fertil Steril. 2000 Jun;73(6):1155–8. doi: 10.1016/s0015-0282(00)00518-5. PMID: 10856474.
41. Rozhivanov RV, Kravtsova NS, Kurbatov DG. Urologiia. 2016;(1 Suppl 1):54–8.
42. Гордиенко ЕА, Ишков ГС, Розанов ЛФ. Обезвоживание и некоторые механизмы криоповреждения клеток при низкотемпературном консервировании суспензии. Криобиология и криомедицина. 1977;3:29–34.
43. Кулешова ЛГ, Худяков ГА. Повреждение клеток сирийского хомяка при замораживании. Криобиология и криомедицина. 1983;12:24–8.
44. Чернобай НА, Гурина ТМ, Пахомов АВ. Криозащитная эффективность ряда криопротекторов в зависимости от скорости охлаждения. Проблемы криобиологии. 2011;21(3):273–9.
45. Agarwal A, Tvrda E. Chapter 5 Slow Freezing of Human Sperm. Methods Mol Biol. 2017;1568:67–78. doi: 10.1007/978-1-4939-6828-2_5. PMID: 28421489.
46. Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. Anim Reprod Sci. 2000 Aug 18;62(1–3):3–22. doi: 10.1016/s0378-4320(00)00152-4. PMID: 10924818.
47. Kara W.Swanson. The Birth of the Sperm Bank. The Annals of Iowa. 2012;71(3) 241–76. doi.org/10.17077/0003-4827.1645
48. Грищенко ВИ, Пушкарь НС, Пращук ЮС и др. Способ криоконсервирования спермы человека. АС 1103837 СССР, МКИ А01 N 1/00. Опубл. 23.07.84, Бюл. № 27.
49. Грищенко ВИ, Дахно ФВ, Паращук ЮС и др. Криобиология и проблемы бесплодия. Киев: Наукова думка; 1990. 310 с.

50. Грищенко ВИ, Юрченко ГГ. Влияние факторов низкотемпературного консервирования на репродуктивные, эмбриональные и фетальные клетки. Проблемы криобиологии. 1998;4:7–13.
51. Best BP. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions [published correction appears in Rejuvenation Res. 2018 Feb;21(1):87]. Rejuvenation Res. 2015;18(5):422–36. doi:10.1089/rej.2014.1656.
52. Desrosiers P, Légaré C, Leclerc P, Sullivan R. Membranous and structural damage that occur during cryopreservation of human sperm may be time-related events. Fertil Steril. 2006 Jun;85(6):1744–52. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.11.046. Epub 2006 Apr 27. PMID: 16643911.
53. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature. 1949;164(4172):666. doi:10.1038/164666a0.
54. Macías García B, Ortega Ferrusola C, Aparicio IM, et al. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential. Theriogenology. 2012;77(7):1280–89. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.10.033.
55. O’Connell M, McClure N, Lewis SE. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. Hum Reprod. 2002;17(3):704–9. doi:10.1093/humrep/17.3.704.
56. Jeyendran RS, Acosta VC, Land S, Coulam CB. Cryopreservation of human sperm in a lecithin-supplemented freezing medium. Fertil Steril. 2008;90(4):1263–5. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.10.068.
57. Родионова В.Л. Ферментативная активность и морфокинетические свойства спермиев человека до и после низкотемпературного консервирования [Текст] : дис... канд. мед. наук: 14.01.35 / Родионова Валерия Львовна ; Нац. акад. наук Украины, Ин-т проблем криобиологии и криомедицины. – Х., 2005. – 129 л.: рис. – Библиогр.: л. 112–129.

58. Schill WB, Feifel M, Fritz H. Acid extraction of acrosin from human spermatozoa pretreated by different physicochemical methods. Archives of Dermatological Research, 1982,273(3–4):273-85. DOI: 10.1007/bf00409256 PMID: 6762158.
59. Одинцов АА, Кучков ИН, Черкашина ИВ, изобретатели. Способ криоконсервации спермы человека. Патент России № 2257710, A01N1/02. 2005 серп.10.
60. Küpker W, Al-Hasani S, Diedrich K. The use of cryopreserved mature and immature spermatozoa in assisted reproduction. Minerva Ginecol. 2004 Jun;56(3):205–16. PMID: 15258532.
61. Tao Y, Sanger E, Saewu A et al. Human sperm vitrification: the state of the art. Reprod Biol Endocrinol. 2020:18,17 https://doi.org/10.1186/s12958-020-00580-5.
62. Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. Anim Reprod Sci. 2016 Jun;169:2–5. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.02.004. Epub 2016 Feb 3. PMID: 26936658.
63. Koczkur KM, Mourdikoudis S, Polavarapu L, Skrabalak SE. Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. Dalton Trans. 2015;44(41):17883-905. doi:10.1039/c5dt02964c.
64. Chauhan H, Mohapatra S, Munt DJ, Chandratre S, Dash A. Physical-Chemical Characterization and Formulation Considerations for Solid Lipid Nanoparticles. AAPS PharmSciTech. 2016;17(3):640–51. doi:10.1208/s12249-015-0394-x
65. Li J, Hua TC, Gu XL et al. Morphology study of freeze-drying mononuclear cells of human cord blood. Cryo Letters. 2005;26(3):193–200.
66. Паращук ЮС, Скидан НП. Влияние криоконсервирования на сперматозоиды человека в норме и при патологии. Криобиология. 1987;3:22–5.

67. Скидан НП. Влияние условий криоконсервирования на морфофункциональные свойства сперматозоидов человека при патоспермии // Дисс. …канд. биол. наук:.– Харьков, 1988.– 129 с
68. Skaer HB, Franks F, Asquith MH, Echlin P. Polymeric cryoprotectants in the preservation of biological ultrastructure. III. Morphological aspects. J Microsc. 1977;110(3):257–70. doi:10.1111/j.1365-2818.1977.tb00036.x
69. Thirumala S, Wu X, Gimble JM, Devireddy RV. Evaluation of polyvinylpyrrolidone as a cryoprotectant for adipose tissue-derived adult stem cells. Tissue Eng Part C Methods. 2010 Aug;16(4):783–92. doi: 10.1089/ten.TEC.2009.0552.
70. Sakaguchi M, Dominko T, Leibfried-Rutledge ML, Nagai T, First NL. A combination of EGF and IGF-I accelerates the progression of meiosis in bovine follicular oocytes in vitro and fetal calf serum neutralizes the acceleration effect. Theriogenology. 2000;54(8):1327–42. doi:10.1016/s0093-691x(00)00439-8.
71. Liu Y, Feenan K, Chapple V, Roberts P, Matson P. Intracytoplasmic sperm injection using hyaluronic acid or polyvinylpyrrolidone: a time-lapse sibling oocyte study. Hum Fertil (Camb). 2019;22(1):39–45. doi:10.1080/14647273.2017.1366077.
72. Torki-Boldaji B, Tavalaee M, Bahadorani M, Nasr-Esfahani MH. Selection of physiological spermatozoa during intracytoplasmic sperm injection. Andrologia. 2017;49(1):10.1111/and.12579. doi:10.1111/and.12579
73. Kato Y, Nagao Y. Effect of PVP on sperm capacitation status and embryonic development in cattle. Theriogenology. 2009;72(5):624–35. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.04.018.
74. Kato Y, Nagao Y. Effect of polyvinylpyrrolidone on sperm function and early embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in human assisted reproduction. Reprod Med Biol. 2012;11(4):165–76. doi:10.1007/s12522-012-0126-9.

75. Cohen J, Garrisi GJ. Micromanipulation of gametes and embryos: Cryopreservation of a single human spermatozoon within an isolated zona pellucida. Hum Reprod Update 1997;3:453. 10.1093/humupd/3.5.453.
76. Timothy G. Schuster, Laura M. Keller, Rodney L. Dunn, Dana A. Ohl, Gary D. Smith. Ultra-rapid freezing of very low numbers of sperm using cryoloops. Human Reproduction. 2003;18(4):788–95. https://doi.org/10.1093/humrep/deg162.
77. Isachenko V, Rahimi G, Mallmann P, Sanchez R, Isachenko E. Technologies of cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa: asepticity as criterion of effectiveness. Andrology. 2017;5(6):1055–63. doi:10.1111/andr.12414.
78. Курило ЛФ, Петрова ЕВ, Макарова НП. Биологическая безопасность образцов (сперматозоидов, ооцитов и эмбрионов человека) при длительном хранении в жидком азоте. Андрология и генитальная хирургия. 2013;2:40–5.
79. Herrler A, Eisner S, Bach V, Weissenborn U, Beier HM. Cryopreservation of spermatozoa in alginic acid capsules. Fertil Steril. 2006;85(1):208–13. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.06.049.
80. Peng QP, Cao SF, Lyu QF, et al. A novel method for cryopreservation of individual human spermatozoa. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2011; 47:565–72. 10.1007/s11626-011-9428-1.
81. Endo Y, Fujii Y, Shintani K, et al. Simple vitrification for small numbers of human spermatozoa. Reprod Biomed Online. 2012;24:301–7. 10.1016/j.rbmo.2011.11.016.
82. Herbemont C, Mnallah S, Grynberg M, Sifer C. Étude prospective comparant plusieurs techniques de congélation de faibles nombres de spermatozoïdes humains [Prospective comparison of different techniques for cryopreservation of small numbers of human spermatozoa]. Gynecol Obstet Fertil Senol. 2019;47(11):797–801. doi:10.1016/j.gofs.2019.09.014

83. Isachenko V, Isachenko E, Katkov II, 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. doi:10.1095/biolreprod.104.028811.
84. Pabón D, Meseguer M, Sevillano G, et al. A new system of sperm cryopreservation: evaluation of survival, motility, DNA oxidation, and mitochondrial activity. Andrology. 2019;7(3):293–301. doi:10.1111/andr.12607.
85. Mansilla MA, Merino O, Risopatrón J, Isachenko V, Isachenko E, Sánchez R. High temperature is essential for preserved human sperm function during the devitrification process. Andrologia. 2016;48(1):111–3. doi:10.1111/and.12406.
86. Ali Mohamed MS. Slow cryopreservation is not superior to vitrification in human spermatozoa; an experimental controlled study. Iran J Reprod Med. 2015;13(10):633–44.
87. Подуфалий ВВ. Криоконсервирование единичных эпидидимальных и тестикулярных сперматозоидов в микрообъеме. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2013;23(2):168.
88. Дроздов АЛ, Иванков ВН. Морфология гамет животных. Значение для систематики и филогенетики. М.: Изд. дом «Круглый год»; 2000. 460 с.
89. Белоус АМ, Гордиенко ЕА, Розанов ЛФ. Замораживание и криопротекция. М.: Высш. шк.; 1987. 80 с.
90. Белоус АМ, Грищенко ВИ. Криобиология. К.: Наук. думка; 1994. 430 с.
91. Гольцев АН. и др. Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины. Х.: Ин-т проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины; 2012. 767 с.

92. Coppola G, Di Caprio G, Wilding M, et al. Digital holographic microscopy for the evaluation of human sperm structure. Zygote. 2014;22(4):446–54. doi:10.1017/S0967199413000026.
93. Gatimel N, Moreau J, Parinaud J, Léandri RD. Sperm morphology: assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017. Andrology. 2017;5(5):845–62. doi:10.1111/andr.12389.
94. Lehti MS, Sironen A. Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects. Biol Reprod. 2017;97(4):522–36. doi:10.1093/biolre/iox096.
95. Леонтьева ОА, Воробьева ОА. Сравнительный анализ морфологии сперматозоидов человека: нативный эякулят прогрессивно подвижная фракция. Проблемы репродукции. 1999; 3:29–36.
96. 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.
97. Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. Fertil. Steril. 1986; 46:118–23.
98. Jouannet P, Ducot B, Feneux D, Spira A. Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. 1. Study of sperm characteristics. J. Androl.1988; l(11):379–94.
99. Aziz N, Buchan I, Taylor C et al. The sperm deformity index: a reliable predictor of the outcome of oocyte fertilization in vitro. Fertil. Steril. 1996; 66:1000–8.
100. Попова АВ, Клещев МА, Осадчук АВ, Гуторова НВ, Осадчук ЛВ. Морфологический анализ сперматозоидов и связь морфологических аномалий сперматозоидов с другими показателями спермограммы. Вестник НГУ. 2011; 9(3):47–54.

101. Buffone M, Ijuri T, Cao W et al. Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. Mol Repr Dev. 2012;79:4–18.

102. Гордиенко ЕА, Пушкарь НС. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. Наукова думка; 1994. 142 с.

103. Гурина ТМ, Кирилюк АЛ. Определение температурных интервалов фазовых преобразований в компонентах криозащитных сред методом термопластической деформации. Проблемы криобиологии. 2012;22(4):410–22.

104. Cassuto NG, Bouret D, Plouchart JM, Jellad S, Vanderzwalmen P, Balet R, et al. A new real-time morphology classification for human spermatozoa: a link for fertilization and improved embryo quality. Fertil Steril. 2009;92(5):1616–25.

105. Gatimel N, Leandri R, Parinaud J. Sperm vacuoles are not modified by freezing-thawing procedures. Reprod Biomed Online. 2013;26(3):240–6.

106. Boitrelle F, Albert M, Theillac C, Ferfouri F, Bergere M, Vialard F, et al. Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin decondensation. J Androl. 2012;33(6):1371–8.

107. Agha-Rahimi A, Khalili MA, Nottola SA, Miglietta S, Moradi A. Cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa in new artificial seminal fluid. Andrology. Andrology. 2016;4(6):1037–44.

108. Taherzadeh S, Khalili MA, Agha-Rahimi A, Anbari F, Ghazali S, Macchiarelli G. Vitrification Increased Vacuolization of Human Spematozoa: Application of MSOME Technology. J Reprod Infertil. 2017;18(2):225–30.

109. Le MT, Nguyen TTT, Nguyen TT, et al. Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification versus conventional rapid freezing:

Effects on motility, viability, morphology and cellular defects. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2019;234:14–20. doi:10.1016/j.ejogrb.2019.01.001.

110. Ruiz-Pesini E, Lapeña AC, Díez-Sanchez C, Alvarez E, Enríquez JA, López-Pérez MJ. Seminal quality correlates with mitochondrial functionality. Clin Chim Acta. 2000;300:97–105.

111. Barbagallo F, La Vignera S, Cannarella R, Aversa A, Calogero AE, Condorelli RA. Evaluation of Sperm Mitochondrial Function: A Key Organelle for Sperm Motility. J Clin Med. 2020;9(2):363. Published 2020 Jan 29. doi:10.3390/jcm9020363.

112. Gallon F, Marchetti C, Jouy N, Marchetti P. The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. Fertil Steril. 2006;86(5):1526–30. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.03.055.

113. de Paula TS, Bertolla RP, Spaine DM, Cunha MA, Schor N, Cedenho AP. Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. Fertil Steril. 2006 Sep;86(3):597–600. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.01.047. PMID: 16952507.

114. Petyim S, Choavaratana R. Cryodamage on sperm chromatin according to different freezing methods, assessed by AO test. J Med Assoc Thai. 2006 Mar;89(3):306–13. PMID: 16696413.

115. Menezo Y. L’ovocyte réparateur de l’ADN du spermatozoide [Oocyte capacity to repair DNA damage induced in sperm]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris). 2006;35(5 Pt 2):2S19–2S23.

116. Meseguer M, Santiso R, Garrido N, García-Herrero S, Remohí J, Fernandez JL. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. Fertil Steril. 2011;95(1):124–8. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.05.055.

117. Ibrahim Y, Hotaling J. Sperm Epigenetics and Its Impact on Male Fertility, Pregnancy Loss, and Somatic Health of Future Offsprings [published correction appears in Semin Reprod Med. 2018 May;36(3-04):233–5]. Semin Reprod Med. 2018;36(3-04):233–9. doi:10.1055/s-0038-1677047.

118. Castillo-Fernandez JE, Loke YJ, Bass-Stringer S, et al. DNA methylation changes at infertility genes in newborn twins conceived by in vitro fertilisation. Genome Med. 2017;9(1):28. Published 2017 Mar 24. doi:10.1186/s13073-017-0413-5.

119. Denomme MM, McCallie BR, Parks JC, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Alterations in the sperm histone-retained epigenome are associated with unexplained male factor infertility and poor blastocyst development in donor oocyte IVF cycles. Hum Reprod. 2017;32(12):2443–55. doi:10.1093/humrep/dex317.

120. Wang L, Jordan IK. Transposable element activity, genome regulation and human health. Curr Opin Genet Dev. 2018;49:25–33. doi:10.1016/j.gde.2018.02.006.

121. Rajabi H, Mohseni-Kouchesfehani H, Eslami-Arshaghi T, Salehi M. Sperm DNA fragmentation affects epigenetic feature in human male pronucleus. Andrologia. 2018;50(1):10.1111/and.12800. doi:10.1111/and.12800.

122. Casanovas A, Ribas-Maynou J, Lara-Cerrillo S, et al. Double-stranded sperm DNA damage is a cause of delay in embryo development and can impair implantation rates. Fertil Steril. 2019;111(4):699–707.e1. doi:10.1016/j.fertnstert.2018.11.035.

123. Georgadaki K, Khoury N, Spandidos DA, Zoumpourlis V. The molecular basis of fertilization (Review). Int J Mol Med. 2016;38(4):979–86. doi:10.3892/ijmm.2016.2723.

124. González-Marín C, Gosálvez J, Roy R. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. Int J Mol

Sci. 2012;13(11):14026–52. Published 2012 Oct 31. doi:10.3390/ijms131114026.

125. Englert Y, Delvigne A, Vekemans M, et al. Faut-il utiliser du sperme frais ou congelé en fécondation “in vitro” avec donneur? [Should one use fresh or frozen sperm in in-vitro fertilization with donors?]. Acta Urol Belg. 1989;57(1):83–91.

126. Schachter-Safrai N, Karavani G, Levitas E, et al. Does cryopreservation of sperm affect fertilization in nonobstructive azoospermia or cryptozoospermia? Fertil Steril. 2017;107(5):1148–52. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.03.009.

127. Karabulut S, Aksünger Ö, Ata C, Sağıroglu Y, Keskin İ. Artificial oocyte activation with calcium ionophore for frozen sperm cycles. Syst Biol Reprod Med. 2018;64(5):381–8. doi:10.1080/19396368.2018.1452311.

128. Hamatani T, Carter MG, Sharov AA, Ko MS. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. Dev Cell. 2004;6(1):117–31. doi:10.1016/s1534-5807(03)00373-3.

129. Marchetti F, Essers J, Kanaar R, Wyrobek AJ. Disruption of maternal DNA repair increases sperm-derived chromosomal aberrations. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104(45):17725–9. doi:10.1073/pnas.0705257104.

130. Colaco S, Sakkas D. Paternal factors contributing to embryo quality. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2018 Nov;35(11):1953–68. DOI: 10.1007/s10815-018-1304-4.

131. Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. Nature. 2009;460(7254):473–8. doi:10.1038/nature08162.

132. Кундієв Ю.І. Антологія біоетики. Львів: БАК; 2003. 592 с.

133. Krausz C, West K, Buckingham D, Aitken RJ. Develoment of technique for monitoring the contamination of human semen samples with leukocytes. Fert.Ster. 1992;57(6):1317–25.

134. Рубенков АА. Ценное достижение в технике одновременного подсчета нормальных и патологических сперматозоидов. Животноводство.1959;2:64.

135. Jeyndran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J. Reprod. Fertil. 1984;70:219–28.

136. Conklin B, Richter E, Kreutziger K et al. Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft. Med Eng & Physics. 2002;24(3):173–83.

137. Репин НВ, Марченко ЛН, Говоруха ТП, Михайлова ИП, Манченко АА, Сандомирский БП. Ультраструктура тканей перикарда и створок аортального клапана свиньи, девитализированных крио- и радиационным воздействием. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2015;25(3):246–54.

138. Reers M, Smiley ST, Mottola-Hartshorn C, Chen A, Lin M, Chen LB. Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. Methods in enzymology. 1995;260:406–17. pmid:8592463

139. Rappa KL, Rodriguez HF, Hakkarainen GC, Anchan RM, Mutter GL, and Asghar W. Sperm processing for advanced reproductive technologies: Where are we today? Biotechnol Adv. 2016;34:578–87.

140. Setti AS, de Almeida Ferreira Braga DP, Vingris L, de Cassia Savio Figueira R, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. The prevalence of sperm with large nuclear vacuoles is a prognostic tool in the prediction of ICSI success. J Assist Reprod Genet. 2014;31(3):307–312. doi:10.1007/s10815-013-0157-0.

141. Gaspard O, Vanderzwalmen P, Wirleitner B, et al. Impact of high magnification sperm selection on neonatal outcomes: a retrospective study. J Assist Reprod Genet. 2018;35(6):1113–21. doi:10.1007/s10815-018-1167-8.

142. Chang V, Heutte L, Petitjean C, Härtel S, Hitschfeld N. Automatic classification of human sperm head morphology. Comput Biol Med. 2017;84:205–16. doi:10.1016/j.compbiomed.2017.03.029.

143. Shaker F, Monadjemi SA, Alirezaie J, Naghsh-Nilchi AR. A dictionary learning approach for human sperm heads classification. Comput Biol Med. 2017;91:181–90. doi:10.1016/j.compbiomed.2017.10.009.

144. Cao X, Cui Y, Zhang X, Lou J, Zhou J, Wei R, et al. The correlation of sperm morphology with unexplained recurrent spontaneous abortion: A systematic review and meta-analysis. Oncotarget 2017;8:55646–56. DOI: 10.18632 / oncotarget.17233.

145. Setti AS, Braga DP, Vingris L, et al. Sperm morphological abnormalities visualised at high magnification predict embryonic development, from fertilisation to the blastocyst stage, in couples undergoing ICSI. J Assist Reprod Genet. 2014;31(11):1533–9. doi:10.1007/s10815-014-0326-9.

146. Ray PF, Toure A, Metzler-Guillemain C, Mitchell MJ, Arnoult C, Coutton C. Genetic abnormalities leading to qualitative defects of sperm morphology or function. Clin Genet. 2017;91(2):217–32. doi:10.1111/cge.12905.

147. Afzelius B. Electron microscopy of the sperm tail results obtained with a new fi xative. J Biophys Bioch Cytol. 1959; 5(2):269–78.

148. Хаят СШ, Брагина ЕЕ, Курило ЛФ. Ультраструктурное исследование сперматозоидов у пациентов с астенозооспермией. Андрология и генитальная хирургия. 2012;13(4):54–61.

149. Chemes HE, Rawe VY. The making of abnormal spermatozoa: cellular and molecular mechanisms underlying pathological spermiogenesis. Cell Tissue Res. 2010;341(3):349–57.

150. 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.

151. Petrushko MP, Pavlovich EV, Pinyaev 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.

152. Marchetti, P., Ballot, C., Jouy, N., Thomas, P., & Marchetti, C. Influence of mitochondrial membrane potential of spermatozoa on in vitro fertilisation outcome. Andrologia. 2012;44(2):136–41. doi:10.1111/j.1439-0272.2010.01117.x.

153. Kozlovsky P, Gefen A. Sperm penetration to the zona pellucida of an oocyte: a computational model incorporating acrosome reaction. Comput Methods Biomech Biomed Engin. 2016;16(10):1106 –11.

154. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. N Eng J Med. 2001;345:1388–93.

155. Keefe D, Kumar M, Kalmbach K. Oocyte competency is the key to embryo potential. Fertil Steril. 2015 Feb;103(2):317–22. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.12.115.

156. Петрушко МП., Будерацька НО. Варіабельність морфологічних параметрів як критерій прогнозу ефективності кріоконсервування ооцитів людини. Морфологія. 2016;10(4):18–22.

157. Hammitt DG, Walker DL, Williamson RA. Concentration of glycerol required for optimal survival and in vitro fertilizing capacity of frozen sperm is dependent on cryopreservation medium. Fertil Steril. 1988;49(4):680–7. doi:10.1016/s0015-0282(16)59840-9.

158. Gao DY, Liu J, Liu C, et al. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. Hum Reprod. 1995;10(5):1109–22. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a136103.

159. Miyagi-Shiohira C, Kurima K, Kobayashi N, et al. Cryopreservation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Med.* 2015;8(1-2):3–7. Published 2015 Aug 26. doi:10.3727/215517915X689100.

160. Ray SS, Pramanik K, Sarangi SK, Jain N. Serum-free non-toxic freezing solution for cryopreservation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett*. 2016;38(8):1397–404. doi:10.1007/s10529-016-2111-6.

161. Bakaltcheva I, Ganong JP, Holtz BL, Peat RA, Reid T. Effects of high-molecular-weight cryoprotectants on platelets and the coagulation system. Cryobiology. 2000 Jun;40(4):283–93. doi: 10.1006/cryo.2000.2247. PMID: 10924260.

162. Kim CG, Yong H, Lee G, Cho J. Effect of the polyvinylpyrrolidone concentration of cryoprotectant on mouse embryo development and production of pups: 7.5% of PVP is beneficial for in vitro and in vivo development of frozen-thawed mouse embryos. J Reprod Dev. 2008; 54(4):250–3.

163. Herrera JA, Quintana JA, López MA, Betancourt M, Fierro R. Individual cryopreservation with dimethyl sulfoxide and polyvinylpyrrolidone of ejaculates and pooled semen of three avian species. Arch Androl. 2005; 51(5):353–60.

164. Volpes A, Sammartano F, Rizzari S, Gullo S, Marino A, Allegra A. The pellet swim-up is the best technique for sperm preparation during in vitro fertilization procedures. J Assist Reprod Genet. 2016;33(6):765–770. doi:10.1007/s10815-016-0696-2.

165. Подуфалий ВВ. Клинический опыт использования криоконсервированных сперматозоидов, полученных при биопсии у

пациентов с азооспермией. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2013;23(3):260–6.

166. Pusch HH. The importance of sperm motility for the fertilization of human oocytes in vivo and in vitro. *Andrologia*. 1987;19(5):514–27. doi:10.1111/j.1439-0272.1987.tb01891.x.

167. Donnelly ET, Steele EK, McClure N, Lewis SE. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. Hum Reprod. 2001;16(6):1191–9. doi:10.1093/humrep/16.6.1191.

168. Perdrix A, Saidi R, Menard J., et al. Relationship between conventional sperm parameters and motile sperm organelle morphology examination (MSOME). Int J Androl 2012; 35(4):491–8. doi: 10.1111 / j.1365-2605.2012.01249.x.

169. Komiya A, Watanabe A, Kawauchi Y, et al. Sperm with large nuclear vacuoles and semen quality in the evaluation of male infertility. Systems Biology in Reproductive Medicine. 2013;59(1):13–20. doi:10.3109/19396368.2012.729174.

170. Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A.Does the presence of nuclear va cuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? Hum Reprod. 2006; 21(7): 1787–90. doi:10.1093/humrep/del049.

171. Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P., et al. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. Reprod Biomed Online 2008; 17(5):617–27. doi:10.1016/s1472-6483(10)60308-2.

172. Sermondade N, Hafhouf E, Dupont C., et al. Successful childbirth after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection without assisted oocyte activation in a patient with globozoospermia. Hum Reprod 2011;26:2944–9. doi:10.1093/humrep/der258.

173. Oliveira J, Massaro F, Baruffi R., et al. Correlation between semen analysis by motile sperm organelle morphology examination and sperm

DNA damage. Fertil Steril 2010;94(5):1937–40. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.01.042

174. Franco J, Baruffi R, Mauri A., et al. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: Implications for ICSI. Reprod Biomed Online 2008; 17(1):42–5. doi:10.1016/s1472-6483(10)60291-x.

175. Kacem O, Sifer C, Barraud–Lange V, et al. Sperm nuclear vacuoles, as assessed by motile sperm organellar morphological examination, are mostly of acrosomal origin. Reprod Biomed Online 2010; 20(1):132–7. doi:10.1016/j.rbmo.2009.10.014.

176. Montjean D, Belloc S, Benkhalifa M et al. Sperm vacuoles are linked to capacitation and acrosomal status. Human Reproduction. 2012; 27(10): 2927–32. doi:10.1093/humrep/des266.

177. Neyer A, Vanderzwalmen P, Bach M, et al. Sperm head vacuoles are not affected by in–vitro conditions, as analysed by a system of sperm–microcapture channels. Reproductive BioMedicine Online. 2013; 26(4):368–77.

178. Wilding M, Coppola G, Di Matteo L, et al. Intracytoplasmic injection of morphologically selected spermatozoa (IMSI) improves outcome after assisted reproduction by deselecting physiologically poor quality spermatozoa. J Assist Reprod Genet. 2011;28(3):253–62.

179. Boitrelle F, Ferfouri F, Petit J et al. Large human sperm vacuoles observed in motile spermatozoa under high magnification: Nuclear thumbprints linked to failure of chromatin condensation. Hum Reprod. 2011; 26(7):1650–8. doi:10.1093/humrep/der129.

180. Perdrix A, Travers A, Clatot F., et al. Modification of chromosomal architecture in human spermatozoa with large vacuoles. Andrology 2013; 1(1):57–66. doi:10.1111/j.2047-2927.2012.00016.x.

181. Agarwal A, Borges Jr A, Setti A.Noninvasive sperm selection for in vitro fertilization. Berlin: Springer; 2015. 113–6.

182. Almeida C, Sousa M, Barros A.Phosphatidylserine translocation in human spermatozoa from impaired spermatogenesis. Reprod Biomed Onli ne. 2009; 19(6):770–7. doi:10.1016/j.rbmo.2009.10.002.

183. Kotwicka M, Filipiak K, Jedrzejczak P., et al. Caspase–3 activation and phosphatidylserine membrane translocation in human spermatozoa: is there a relationship? Reprod Biomed Online. 2008;16(5):657–63. doi:10.1016/s1472-6483(10)60479-8.

184. Lavolpe M, Lorenzi D, Greco E et al. Relationship Between Sperm DNA Fragmentation and Nuclear Vacuoles. JBRA Assist Reprod. 2015;19(2):70–4. doi:10.5935/1518–0557.20150016.

185. Menkveld R, Oettle EE, Kruger TF, Swanson RJ, Acosta AA, Oehninger S. Atlas of human sperm morphology. Baltimore, MD: Williams & Wilkins; 1991.

186. Garolla A, Fortini D, Menegazzo M, De Toni L, Nicoletti V, Moretti A, et al. High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. Reprod Biomed Online. 2008;17(5):610–6.

187. Punyatanasakchai P, Sophonsritsuk A, Weerakiet S, Chompurat D. Comparison of cryopreserved human sperm in vapor and liquid phases of liquid nitrogen: effect on motility parameters, morphology, and sperm function. Fertil Steril. 2008; 90(5):1978–82.

188. Lee CY, Lee CT, Wu CH, et al. Kruger strict morphology and post-thaw progressive motility in cryopreserved human spermatozoa. Andrologia. 2012;44 Suppl 1:81–6.

189. Fortunato A, Boni R, Leo R, et al. Vacuoles in sperm head are not associated with head morphology, DNA damage and reproductive success. Reprod Biomed Online. 2016;32(2):154–61. doi:10.1016/j.rbmo.2015.10.009.

190. Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW & Crowe JH. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell

membranes: a demonstration using sperm as a model. Journal of Experimental Zoology. 1993;256:432–7.

191. Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. Theriogenology. 2000; 5:47–58.

192. O'Connell M, McClure N & Lewis SEM. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. Human Reproduction. 2002;17:704–9.

193. Avidor-Reiss T, Mazur M, Fishman EL, Sindhwani P. The Role of Sperm Centrioles in Human Reproduction – The Known and the Unknown. Front Cell Dev Biol. 2019;7:188. Published 2019 Oct 1. doi:10.3389/fcell.2019.00188.

194. Khalil WA, El-Harairy MA, Zeidan AEB, Hassan MAE, Mohey-Elsaeed O. Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. Int J Vet Sci Med. 2017;6(Suppl):S49–S56. Published 2017 Nov 22. doi:10.1016/j.ijvsm.2017.11.001.

195. Петрушко МП, Павлович ОВ, Піняєв ВІ, Волкова НО, Подуфалий ВВ. Апоптоз і процеси фрагментації ДНК у нативних і кріоконсервованих сперміях людини при нормо- та патоспермії. Цитология и генетика. 2017;51(4):52–6.

196. Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. CMAJ.2006;175(5):495–500. doi:10.1503/cmaj.060218.

197. Hammadeh ME, Szarvasy D, Zeginiadou T, Rosenbaum P, Georg T, Schmidt W. Evaluation of cryoinjury of spermatozoa after slow (programmed biological freezer) or rapid (liquid nitrogen vapour) freeze-thawing techniques. J Assist Reprod Genet 2001;18:364–70. doi:10.1023/A:1016666221500.

198. Tavokina LV. Male infertility. Genetic aspects. Kidneys. 2014;2:9–13.

199. Gosalvez J, Cortes-Gutierrez E, Lypez-Fernandez C. et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. Fert. Ster. 2009;9(1):170–3.

200. Roychoudhury S, Maldonado-Rosas I, Agarwal A, Esteves SC, Henkel R, Sharma R. Human sperm handling in intracytoplasmic sperm injection processes: In vitro studies on mouse oocyte activation, embryo development competence and sperm oxidation-reduction potential [published online ahead of print, 2018 Jan 9]. Andrologia. 2018;10.1111/and.12943. doi:10.1111/and.12943.

201. Lachaud C, Tesarik J, Cañadas ML, Mendoza C. Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. Hum Reprod. 2004;19(3):607–10. doi:10.1093/humrep/deh130.

202. Amaral A, Lourenço B, Marques M, Ramalho-Santos J. Mitochondria functionality and sperm quality. Reproduction. 2013;146(5):R163–R174. Published 2013 Oct 1. doi:10.1530/REP-13-0178.

203. Moraes CR, Meyers S. The sperm mitochondrion: Organelle of many functions. Anim Reprod Sci. 2018;194:71–80. doi:10.1016/j.anireprosci.2018.03.024

204. Meseguer M, Garrido N, Martínez-Conejero JA, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Role of cholesterol, calcium, and mitochondrial activity in the susceptibility for cryodamage after a cycle of freezing and thawing. Fertil Steril. 2004;81(3):588–94. doi:10.1016/j.fertnstert.2003.09.035

205. Wang SQ, Wang W, Zhang W. Human Sperm Cryopreservation and Protection: An Update Zhonghua Nan Ke Xue. 2013;19(3):262–5.

206. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Zaneveld LJ. Effect of glycerol and cryopreservation on oocyte penetration by human spermatozoa. Andrologia. 1985;17(3):241–8. doi:10.1111/j.1439-0272.1985.tb00995.x.

207. Liu DY., Baker HW. Assessment of human sperm function and clinical management of male infertility. Zhonghua Nan Ke Xue. 2007; 13(2):99–109.

208. Liu N., Zhang Z., Li Y. Sperm-oocyte interaction and in vitro fertilization clinical outcomes in patients with unexplained infertility. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2011;36(5):439–47.

209. Петрушко МП, Пиняев ВИ, Подуфалий ВВ, Правдина СС, Чуб НН. Беременность после переноса эмбриона, полученного при оплодотворении ооцита, лишенного *Zona pellucida*, криоконсервированным эпидидимальным сперматозоїдаем (описание случая). Проблемы репродукции. 2013;2:62–4.

210. Spargo SC, Hope RM. Evolution and nomenclature of the zona pellucida gene family. Biol Reprod. 2003;68:358–62.

211. Jin R, Bao J, Tang D. et al. Outcomes of intracytoplasmic sperm injection using the zona pellucida-bound sperm or manually selected sperm. J Assist Reprod Genet. 2016;33(5):597–601.

212. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod. 2012;27(10):2908–17. doi:10.1093/humrep/des261

213. Auger J, Jouannet P, Eustache F. Another look at human sperm morphology. Hum Reprod. 2016;31(1):10–23. doi:10.1093/humrep/dev251

214. Sakkas D. The use of blastocyst culture to avoid inheritance of an abnormal paternal genome after ICSI. *Hum Reprod*. 1999;14(1):4–5. doi:10.1093/humrep/14.1.4.

215. Griffiths TA, Murdoch AP, Herbert M. Embryonic development *in vitro* is compromised by the ICSI procedure. Human Reproduction. 2000 July;15(7):1592–6. https://doi.org/10.1093/humrep/15.7.1592.

216. Tsai MY, Huang FJ, Kung FT, et al. Influence of polyvinylpyrrolidone on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. The Journal of Reproductive Medicine. 2000 Feb;45(2):115–20.

217. Gandini L, Lombardo F, Lenzi A, Spanò M, Dondero F. Cryopreservation and sperm DNA integrity. Cell Tissue Bank. 2006;7(2):91–8. doi:10.1007/s10561-005-0275-8

218. Nallella KP, Sharma RK, Said TM, Agarwal A. Inter-sample variability in post-thaw human spermatozoa. Cryobiology. 2004;49(2):195–9. doi:10.1016/j.cryobiol.2004.07.003

219. Kong A, Frigge ML, Masson G, et al. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature*. 2012;488(7412):471–5. doi:10.1038/nature11396

220. Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ Jr & Agarwal A. Effect of in vitro incubation on spontaneous acrosome reaction in fresh and cryopreserved spermatozoa. International Journal of Fertility and Women's Medicine. 1998; 43:235–2.

221. Meseguer M, Garrido N, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Concentration of glutathione and expression of glutathione peroxidases 1 and 4 in fresh sperm provide a forecast of the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. J Androl. 2004;25(5):773–80. doi:10.1002/j.1939-4640.2004.tb02855.x4

222. O'Connell M, McClure N & Lewis SEM. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. Human Reproduction. 2002;17:704–9.

223. Meseguer M, Garrido N, Martinez-Conejero JA, Simon C, Pellicer A & Remohi J. Role of cholesterol, calcium, and mitochondrial activity in the susceptibility for cryodamage after a cycle of freezing and thawing. Fertility and Sterility. 2004;82:514–5.

# ДОДАТОК А

## Список публікацій здобувача за темою дисертації та відомості про апробацію результатів дисертації

### Статті у фахових виданнях, у тому числі закордонних

*1.* Волкова НО, Павлович ОВ, **Гапон АА.** Стан деконденсації хроматину в сперміях людини після кріоконсервування та впливу електромагнітного випромінювання в мілімітровому діапазоні. Біофізичний вісник. 2013; 2:87–94 *(Внесок здобувача:постановка кріобіологічних експериментів, аналіз та узагальнення результатів, підготовка матеріалів до друку).*

2. Павлович ОВ, Ревенко ОБ, **Гапон ГО.** Оптимізація режиму відтавання кріоконсервованої сперми людини при нормо- та патоспермії. Проблемы криобиологии и криомедицины.2016; 26(1):45–52 (Scopus) *(Внесок здобувача:проведення спер міологічного аналізу еякулятів чоловіків при нормо- та патоспермії, виділення сперматозоїдів методом градієнту щільності, постановка кріобіологічних експериментів).*

3. Павлович ЕВ, Петрушко МП, Юрчук ТА, Пиняев ВИ, **Гапон АА.** Тест на пенетрацию с *Zona pellucida* как предиктор оплодотворяющей способности нативных и криоконсервированных сперматозоидов человека. Український журнал медицини, біології та спорту. 2017;1:189–92 *(Внесок здобувача: підготовка Zona pellucida, постановка кріобіологічних експериментів, аналіз та статистична обробка результатів, підготовка статті до друку).*

4. Павлович ОВ, **Гапон ГО**, Юрчук ТО, Петрушко МП. Кріоконсервування сперматозоїдів людини з проникаючими і непроникаючими кріопротекторами. Медицина сьогодні і завтра. 2019; 4(85):27–34 *(Внесок здобувача:розробка ідеї дослідження, постановка експериментальної частини роботи, подача статті до друку).*

5. Петрушко МП, Павлович ОВ, Пуговкін АЮ, Коваленко ІФ, **Гапон ГО**, Піняєв ВІ, Юрчук ТО. Індукція вакуолізації в сперматозоїдах

чоловіків з олгіастенотератозооспермією після кріоконсервування з гліцерином і полівнілпіролідоном. Морфологія. 2020;14(3):148–53 *(Внесок здобувача: реєстрація та підрахунок сперматозоїдів з вакуолізацією, розробка системи категорії оцінки ступені вакуолізації клітин, статистична обробка даних, участь в обговоренні результатів дослідження).*

6. Pavlovych O, **Hapon H**, Yurchuk T, Repin M, Marchenko L, Govorukha T, Petrushko M. Ultrastructural and Functional Characteristics of Human Spermatozoa After Cryopreservation by Vitrification. Probl Cryobiol Cryomed. 2020;30(1):24–33 (Scopus) *(Внесок здобувача:проведення кріобіологічної частини роботи).*

7. Yurchuk T, Petrushko M, **Gapon A**, Piniaiev V, Kuleshova L. The impact of cryopreservation on the morphology of spermatozoa in men with oligoasthenoteratozoospermia. Cryobiology. 2021 Mar 2:S0011-2240(21)00059-6. doi: 10.1016/j.cryobiol.2021.02.009. Epub ahead of print. PMID: 33667435 (Scopus) *(Внесок здобувача:експериментальна частина роботи, проведення статистичного аналізу, аналіз та узагальнення результатів, підготовка матеріалів до друку ).*

Статті у рецензованих виданнях України

8. **Гапон ГО**, Павлович ОВ, Юрчук ТО, Піняєв ВІ, Петрушко МП. Кріоконсервування сперматозоїдів людини в ПВП і сахарозі. Експериментальна і клінічна медицина. 2019;84(3):4–9 *(Внесок здобувача: планування роботи, проведення експериментальної частини роботи, підготовка роботи до друку).*

Статті у збірниках наукових праць

9. Петрушко МП, Пиняев ВИ, Юрчук ТА, Павлович ЕВ, **Гапон АА.** Выбор тактики оплодотворения ооцитов человека криоконсервированными сперматозоидами в программе лечения бесплодия вспомогательными репродуктивными технологиями. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Урологія,

андрологія, нефрологія». 2016. С.152–4 *(Внесок здобувача: проведення кріобіологічної частини роботи).*

10. Петрушко МП, Панасовский НЛ, Аркатов АВ, Павлович ЕВ, Юрчук ТА, Пиняев ВИ, **Гапон АА.** Эмбриологические параметры циклов лечения бесплодия методами ВРТ с использованием криоконсервированных эпидидимальных сперматозоидов. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Урологія, андрологія, нефрологія». 2017. С.106–8 *(Внесок здобувача: проведення кріобіологічної частини експериментів, аналіз та узагальнення результатів, статистична обробка даних).*

11. Петрушко МП, **Гапон ГО,** Юрчук ТО. Кріоконсервування сперматозоїдів людини при ОАТ. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Урологія, андрологія, нефрологія. Досягнення, проблеми, шляхи вирішення». Збірник наукових праць. Харків. 2019. С.147–8 *(Внесок здобувача:проведення кріобіологічної частини експериментів, аналіз літературних джерел).*

Патенти України на корисну модель

**12.** Патент України Патент № 144028. Україна, МПК A01N 1/02. Заявл.27.03.2020, з.н. u 2020 02082. Публ. 25.08.2020. Бюл. № 16. Петрушко МП, Юрчук ТО, **Гапон ГО**, Павлович ОВ. Спосіб кріоконсервування сперматозоїдів чоловіків з вадами сперматогенезу.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

13. Волкова НА, Павлович ЕВ, Николов ОТ, Петрушко МП, **Гапон АА.** Влияние факторов криоконсервирования на морфофункциональные характеристики спермы человека. Тезисы докладов научной конференции «Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины». Харьков, 18–19 октября 2012. Проблемы криобиологии. 2012;22(3):363.

14. Петрушко МП, Павлович ОВ, Волкова НО, Пиняев ВИ, **Гапон АА**, Юрчук ТА. Апоптоз в нативных и криоконсервирвоанных

сперматозоидах. Матеріали 5-го з'їзду клітинної біології з міжнародною участю. Одесса. 2-6 жовтня 2016. С. 12.

15. Павлович ОВ, Петрушко МП, Піняєв ВІ, **Гапон ГО**, Юрчук ТО. Morphological analysis of human spermatozoa at normozoospermia before and after cryopreservation. Матеріали Науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології», м. Дніпро 5-7 жовтня 2016 р. Присвяченої 100-річчю дніпропетровської (Катеринославської) школи морфологів. С.27–28.

16. Павлович ЕВ, Петрушко МП, Юрчук ТА, **Гапон АА**, Пиняев ВИ. Криоконсервирование единичных сперматозоидов путем витрификации в микросоломинках. Матеріали науково-практичної конференції з участю міжнародних спеціалістів, присвяченої дню науки «Медична наука на перетині спеціальностей: сьогодення і майбутнє» 19 травня 2017 р. С.84.

17. **Гапон АА**, Юрчук ТА, Петрушко МП, Павлович ЕВ, Пиняев ВИ. Пенетрационная активность нативных и криоконсервированных сперматозоидов человека. Матеріали міжнародної конференції «Холод в біології та медицині», Х., 2017, С.38.

18. **Gapon GO,** Petrushko MP, Yurchuk TO, Pavlovich OV, Piniaev VI. Survival of Human Spermatozoa After Cryopreservation with No-Wash Procedure. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2018;28(2):171.

19. **Гапон ГО**, Петрушко МП, Юрчук ТО, Піняєв ВІ, Павлович ОВ. Вибір оптимального кріозахисного середовища для заморожування сперматозоїдів людини. Науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 25-річчю НАМНУ. К., 23 березня Журнал Національної Академії Медичних Наук України. Спецвипуск. 2018 р. С.108–109.

20. **Гапон ГО**, Петрушко МП, Юрчук ТО, Павлович ОВ, Піняєв ВІ. Вплив сім'яної плазми на кінетичні характеристики та стан ДНК кріоконсервованих сперматозоїдів людини. Матеріали XV Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні

питання сучасної медицини» до 213-річчя зі дня заснування та 25-річчя зі дня відродження медичного факультету Харківського національного університету В.Н. Каразіна, 25-26 квітня 2018 року. С.61–63.

21. **Hapon HO,** Pavlovich OV, Yurchuk TO, Repin MV, Marchenko LM. Ultrastructural Characteristics of Human Sperm After Cryopreservation with Polyvinylpiralidon by Vitrification. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2019; 29(2):178.

22. **Гапон ГО,** Петрушко МП, Юрчук ТО. Кореляційний зв'язок стану ДНК та кінетичних характеристик сперматозоїдів людини під впливом факторів кріоконсервування методом вітрифікації. Матеріали конференції «Актуальні питання сучасної медицини» 28-29 березня 2019р. С.67–68.

23. Petrushko MP, Yurchuk TA, **Gapon AA**, Pavlovich EV, Pinyaev VI. Micro- and large volumes cryopreservation of single human spermatozoa using non-penetrating cryoprotectant. Society for Low Temperature Biology Annual Meeting 2018 6-7 September 2018, Crop Research Institute (Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.), Czech Republic. CryoLetters. 2019;40(5):257–74.

24. **Gapon G,** Yurchuk T, Pavlovich O, Petrushko M. DNA fragmentation of cryopreserved human sperm of men with pathospermia. Biopolimers and cell. 2019;35(5):399.

25. Pavlovich O, Piniaiev V, Yurchuk T. **Gapon G,** Petrushko M. Level of lipid peroxidation and antioxidant protection state in native and cryopreserved human spermatozoa. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу, м.Тернопіль, 30 вересня-4 жовтня 2019. С.122

26. **Гапон ГО,** Юрчук ТО, Петрушко МП. Оцінка морфологічних характеристик сперматозоїдів людини для вибору метода запліднення ооцитів у програмах ДРТ. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Актуальні проблеми морфології в теоретичній та практичній медицині». 24-25 жовтня 2019р, Чернівці. С.44–6.

27. **Гапон ГО**, Павлович ОВ. Кріоконсервування сперматозоїдів людини з полівінілпіролідоном за олігоастенотератозооспермії. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2020;30(3):296.

28. **Гапон ГО**, Павлович ОВ, Юрчук ТО, Пінаєв ВІ, Петрушко МП. Стан хроматину в сперматозоїдах людини після кріоконсервування. Матеріали четвертої всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» 4-6 листопада 2020 р, Дніпро. С.18.

29. **Гапон ГО**, Павлович ОВ, Юрчук ТО, Пінаєв ВІ, Петрушко МП. Оцінка морфологічних параметрів сперматозоїдів, кріоконсервованих з ПВП. Матеріали XVII міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання сучасної медицини». Харків, 2020. С.72–3.

30. Petrushko MP, Pavlovich OV, Puhovkin AYu, Kovalenko IF, **Gapon GO**, Pinyaev VI, Yurchuk TO. Induction of vacuolizationin spermatozoa from men with oligoasthenoteratozoospermia after cryopreservation with glycerol and PVP матеріали четвертої всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародноюучастю «Теорія та практика сучасної морфології» 4-6 листопада 2020 р; Дніпро, Україна с. 87–8.

# ДОДАТОК Б

## Апробація результатів дисертації.

Результати роботи були представлені на наступних наукових конференціях: Присвяченій 100-річчю дніпропетровської (катеринославської) школи морфологів (Дніпро, 2016 р.); Науково-практичній конференції молодих вчених, присвяченій 25-річчю НАМНУ (Київ, 2016 рік); 5-му з'їзду клітинної біології з міжнародною участю (Одеса, 2016); науково-практичних конференціях з міжнародною участю «Урологія, андрологія, нефрологія» (2016–2019 рр); XIV – XVII міжнародній науковій конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 2017–2020 рр.); 41-й – 44-й щорічних конференціях молодих вчених «Холод в біології і медицині» (Харків, 2017–2020 рр.); Науково-практичній конференції за участю міжнародних спеціалістів, присвяченій дню науки «Медична наука на перетині спеціальностей: сьогодення і майбутнє» 19 травня 2017 р. (м. Харків); щорічній конференції Society for Low Temperature Biology Annual Meeting 2018, Czech Republic; Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології», XII Українському біохімічному конгресі (м. Тернопіль, 2019 рік); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми морфології в теоретичній та практичній медицині» (Чернівці, 2019); четвертій всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» (4-6 листопада 2020 р; Дніпро, Україна).