

М.П. Петрушко
О.В. Павлович
А.Ю. Пуговкін
І.Ф. Коваленко
В.І. Піняєв
Т.О. Юрчук

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини,
Харків, Україна







Надійшла: 06.08.2020

Прийнята: 20.09.2020

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2020.3.148-153>

УДК 57.086.13: 612.616.2.014.2

ІНДУКЦІЯ ВАКУОЛІЗАЦІЇ В СПЕРМАТОЗОЇДАХ ЧОЛОВІКІВ З ОЛІГОАСТЕНОТЕРАТОЗОСПЕРМІЄЮ ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ З ГЛЦЕРИНОМ І ПОЛІВІНІЛПІРОЛІДОНОМ

Petrushko M.P. , Pavlovich O.V. , Puhovkin A.Yu. , Kovalenko I.F. , Pinyaev V.I. , Yurchuk T.O. 
✉ Induction of vacuolization in spermatozoa from men with oligoasthenoteratozoospermia after cryopreservation with glycerol and polyvinylpyrrolidone.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, Kharkiv, Ukraine.

ABSTRACT. Background. The two-step method using penetrating cryoprotectant glycerol is a routine for cryopreservation of spermatozoa from men with normal spermatogenesis. However, the use of this freezing method in the case of oligoasthenoteratozoospermia (OAT) leads to additional cells damage and there is a need to search for new effective cryopreservation method. The sperm vacuolization inherent in male gametes plays a negative role, reducing the fertilizing ability of cells. **Objective.** The aim of the study was to assess the degree of vacuolization induced in human OAT sperm after cryopreservation by a two-stage method using glycerol and polyvinylpyrrolidone (PVP), molecular mass 360000. **Methods.** The isolated sperm fraction was divided into 3 groups: group I – native spermatozoa, II – spermatozoa cryopreserved by the two-stage method with 10% glycerol, group III – spermatozoa cryopreserved by the two-stage method with 10% PVP. **Results.** About 5% of spermatozoa contained vacuoles in group I. The number of spermatozoa with one small vacuole increased to $(19.68 \pm 2.27)\%$ in group II. And in group III the number of cells without vacuoles was comparable with native spermatozoa: 95.59 ± 1.59 and $(96.09 \pm 2.02)\%$, respectively. **Conclusion.** Thus, the use of a penetrating cryoprotectant of glycerol at 10% concentration for two-stage method cryopreservation of human spermatozoa initiates the vacuoles formation while the use of non-penetrating PVP can prevent vacuolization.

Key words: spermatozoa, cryopreservation, vacuolization.

Citation:

Petrushko MP, Pavlovich OV, Puhovkin AYu, Kovalenko IF, Pinyaev VI, Yurchuk TO. [Induction of vacuolization in spermatozoa from men with oligoasthenoteratozoospermia after cryopreservation with glycerol and polyvinylpyrrolidone]. Morphologia. 2020;14(3):148-53. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2020.3.148-153>

 Petrushko M.P. 0000-0001-8331-5419;  Pavlovich O.V. 0000-0002-0019-7742

 Puhovkin A.Yu. 0000-0003-4765-8849;  Kovalenko I.F. 0000-0003-4957-2352

 Pinyaev V.I. 0000-0003-1889-5482;  Yurchuk T.O. 0000-0002-4993-9129

✉ taisiya.yur@gmail.com

© SI «Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine», «Morphologia»

Вступ

Кріоконсервування стало невід'ємною частиною допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) і використовується для збереження гамет, ембріонів та репродуктивних тканин [1]. Незважаючи на те, що сперматозоїди людини менш чутливі до дії кріогенних факторів, в порівнянні з іншими типами клітин, кріоконсервування має суттєвий вплив на їх морфофункціональні харак-

теристики [2, 3]. Відомо, що ультраморфологічний статус субклітинних органел сперматозоїда в значній мірі визначає їх запліднювальну здатність [4]. Більш того, сперматозоїди, які містять вакуолі, запропоновано виключити з вибірки клітин для інтрацитоплазматичної ін'єкції в ооцит (ICSI) при ДРТ, для підвищення частоти запліднення, покращення розвитку ембріонів і настання вагітності [5,6].

Двоетапний метод з використанням проникаючого кріопротектору гліцерину є рутинним для кріоконсервування сперматозоїдів чоловіків з нормальним спермогенезом. Однак застосування даного методу при заморожуванні сперматозоїдів чоловіків з діагнозом безпліддя в наслідок олігоастенотератозооспермії (ОАТ) призводить до виникнення додаткових ушкоджень клітин [2]. Метою даного дослідження була оцінка ступеня вакуолізації сперматозоїдів людини при ОАТ після кріоконсервування двоетапним методом з використанням проникаючого кріопротектора гліцерину і непроникаючого ПВП.

Матеріали та методи

Досліджували сперматозоїди чоловіків віком 20 до 40 років ($n = 24$) з діагнозом ОАТ. Оцінку репродуктивної функції чоловіків проводили згідно рекомендаціям ВООЗ [7]. Після розрідження еякуляту протягом 40 хв при 37°C аналізували сперміологічні характеристики за допомогою системи CASA [8]. Основними компонентами системи CASA були мікроскоп Olympus IX-71 (Olympus, Японія) з оптикою і позитивною фазовою контрастністю, відеокамера (CCD) і програмне забезпечення для обробки зображень (Sperm Class Analyzer – Automatic system of sperm analysis). Час вимірювання для CASA становив $4 \times 2,6$ с, а частота дискретизації кадрів – 25 Гц.

Рухливу фракцію сперматозоїдів отримували шляхом центрифугування еякуляту в градієнті щільності Sperm Gradiet Kit (Cook, США). Виділену фракцію сперматозоїдів розподіляли на 3 групи: I – нативні сперматозоїди, II – сперматозоїди, кріоконсервовані двоетапним методом з 10% розчином гліцерину (Sigma Aldrich, США), група III – сперматозоїди, кріоконсервовані двоетапним методом з 10% ПВП молекулярною масою 360000 (Cook, США). Кріозахисні розчини готували на середовищі Global total for fertilization (CooperSurgical, США), яке містило 10% сироватковий альбумін людини (CooperSurgical, США).

Кріоконсервування зразків проводили в кріовіалах (Nunc, США), об'єм суспензії становив від 10 до 50 мкл, в залежності від вихідних характеристик біоматеріалу. Виділену фракцію сперматозоїдів змішували у співвідношенні 1:1 з кріозахисним розчином в кріовіалах та після 10 хв інкубації розміщували над дзеркалом рідкого азоту на відстані 10 см та через 10 хв швидко занурювали в рідкий азот. Зразки відігрівали на водяній бані (40°C) до повного зникнення твердої фази.

Для оцінки ступеня вакуолізації виділену фракцію сперматозоїдів поміщали в краплю з ПВП для іммобілізації клітин. Підраховували кількість сперматозоїдів категорії 1 – без вакуолізації, 2 – одна маленька вакуоль, 3 – одна вели-

ка 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).

Всі дослідження були виконані з дотриманням правил біомедичної етики. На проведення досліджень було отримано письмову, вільну і інформовану згоду пацієнтів. Для статистичної обробки використовували програму «Excel» (Microsoft, США). Дані приводили як середнє значення – стандартне відхилення. При порівнянні двох вибірок застосовували t-критерій Фішера - Стьюдента та програму «Excel» (Microsoft, США) при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Було з'ясовано, що $(96,09 \pm 2,02)\%$ нативних сперматозоїдів не містять вакуолей. Проте близько 4% сперматозоїдів цієї групи характеризувалося наявністю вакуолізації (Рис. 1).

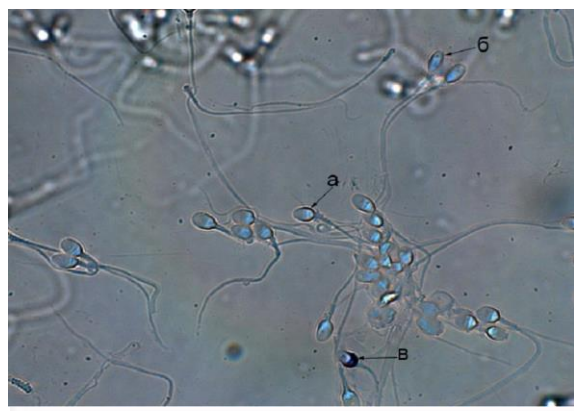


Рис. 1. Сперматозоїди людини з вакуолізацією: а – категорія 1, б – 2, в – 3.

Сперматозоїди з вакуолями, віднесені до категорій 2–4, в групі I зустрічалися в рівній пропорції (табл.). Кріоконсервування сперматозоїдів групи II 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 III кількість клітин без вакуолізації знаходилося на рівні контролю. Кількість сперматозоїдів категорії 2–4 мала тенденцію до зростання в порівнянні з групою 1 ($p > 0,05$).

Частота вакуолізації нативних та кріоконсервованих сперматозоїдів чоловіків з ОАТ

Категорія вакуолізації	Група		
	I	II	III
1	96,09±2,02	77,36±2,96*	95,59±1,59
2	1,45±1,01	19,68±2,27*	1,50±0,96
3	1,54±0,96	1,54±0,96	1,68±0,89
4	1,318±0,99	1,41±0,95	1,63±0,79

Примітка. * – значущі відмінності у порівнянні з відповідним показником групи I і III (P < 0,05).

Рутинний аналіз еякуляту характеризує концентрацію, рухливість і морфологічні характеристики чоловічих гамет [9]. Вакуолізовані сперматозоїди, як правило, класифікують як такі, що мають аномальну морфологію, окремо не виділяючи дану патологію [10]. З часу першого опису вакуолей головки сперматозоїдів з використанням спостереження рухливих сперматозоїдів в реальному часі [11], класифікація вакуолей за їх розташуванням, кількістю та розмірами не були чітко визначені. Великі вакуолі визначалися як такі, що займали більше 4% від загальної площини головки [12, 13, 14].

Клітинні вакуолі утворюються з мембранних бульбашок, внаслідок відділення частини ендоплазматичного ретикулуму та комплексу Гольджі. Думки авторів щодо походження вакуолей сперматозоїдів суперечливі: одні вважають, що вакуолі виникають всередині ядра, інші – повідомляють про їх акросомальне походження [15–19]. Показано, що сперматозоїди, які не містять вакуолей, мають більш низьку частоту фрагментації ДНК у порівнянні з вакуолізованими [20]. Ряд досліджень показали кореляцію між порушеннями конденсації хроматину та його дезорганізацією з вакуолізацією. [21, 22]. Згідно А. Agarwal зі співавт. вакуолі відображають порушення упаковки хроматину і фрагментації ДНК [23]. Фрагментація ДНК може бути пов'язана з процесами апоптозу, оскільки в сперматозоїдах людини були виявлені апоптотичні маркери, такі як: екстерналізація фосфатидилсерину та каспаз 3 [24, 25]. Показано, що у пацієнтів з нормозооспермією відсутність вакуолей в клітинах, або наявність невеликих вакуолей (менше 20% поверхні ядра) корелює з наявністю нефрагментованою ДНК [26]. Було описано значне збільшення вакуолізації сперматозоїдів після кріоконсервування методом вітрифікації [27]. Незважаючи на те, що при вітрифікації використовували невисокі концентрації кріопротекторів, після відігріву кількість клітин з нормальними морфологічними характеристиками знижувалося за рахунок збільшення сперматозоїдів з вакуолізацією. N. Gatimel зі співавт. повідомили, що повільне заморожування не викликає істотного її збільшен-

ня [28]. З іншого боку, F. Biotrelle зі співавт. експериментально показали зниження кількості рухливих сперматозоїдів і індукцію утворення вакуолей після повільного заморожування [29]. Негативний ефект гліцерину при використанні даного методу кріоконсервування швидше за все пов'язаний з тим, що не відбувається термодинамічної рівноваги 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 непроникаючого кріопротектору, імовірно, призводить до достатньої регідратації клітин, тим самим знижує пошкодження внутрішньоклітинними кристалами льоду, які викликають вакуолізацію.

Підсумок

Частота вакуолізації в нативних сперматозоїдах людини при ОАТ становить близько 4%. Кріоконсервування двоетапним методом з гліцерином індукує вакуолізацію з утворенням переважно дрібних вакуолей. Застосування в якості кріопротектору 10% ПВП запобігає утворенню вакуолей, що розкриває його переваги та перспективи щодо заморожування репродуктивних клітин чоловіків з патологіями сперматогенезу.

Перспектива подальших досліджень – вивчення впливу вакуолізації нативних і кріоконсервованих сперматозоїдів на частоту фрагментації ДНК, запліднення ооцитів та розвитку *in vitro* ембріонів до стадії бластоцисти.

Джерела фінансування

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної роботи «Оцінка ступеня фрагментації ДНК сперматогенних клітин на різних стадіях диференціювання як обов'язкового компонента технології їх кріоконсервування» (номер державної реєстрації 0120U100378).

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Літературні джерела
References

1. Buriak I, Fleck R, Goltsev A, Shevchenko N, Petrushko M, Yurchuk T, Puhovkin A, Rozanova S, Guibert EE, Robert MC, de Paz LJ, Powell-Palm MJ, Fuller B. Translation of Cryobiological Techniques to Socially Economically Deprived Populations—Part 1: Cryogenic Preservation Strategies. *Journal of Medical Devices*. 2020; 14(1): 010801. <https://doi.org/10.1115/1.4045878>.
2. Petrushko M.P., Pavlovich E.V., Pinyaev V.I., et al. [Apoptosis and processes of DNA fragmentation in native and cryopreserved human sperm cells at normo- and pathospermia]. *Tsitol Genet*. 2017; 51(4):52–56. Ukrainian. doi: 10.3103/S0095452717040065
3. Hezavehei M, Sharafi M, Koucheshahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaeili V, Shahverdi A. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod Biomed Online*. 2018;37(3):327–339. doi:10.1016/j.rbmo.2018.05.012
4. 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. doi.org/10.15407/cryo30.01.024.
5. Falagario D, Brucculeri AM, Depalo R, Trerotoli P, Cittadini E, Ruvolo G. Sperm head vacuolization affects clinical outcome in ICSI cycle. A proposal of a cut-off value. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29(11):1281–1287. doi:10.1007/s10815–012–9858–z.
6. Sakkas D. Novel technologies for selecting the best sperm for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2013. 99(4):1023–1029. doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.12.025
7. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen fifth edition. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. 2010. 287p.
8. Talarczyk-Desole J, Berger A, Taszarek-Hauke G, Hauke J, Pawelczyk L, Jedrzejczak P. Manual vs. computer-assisted sperm analysis: can CASA replace manual assessment of human semen in clinical practice? *Ginekol Pol*. 2017;88(2):56–60. doi:10.5603/GP.a2017.0012.
9. Perdrix A, Saïdi R, Ménard JF, Gruel E, Milazzo JP, Macé B, Rives N. Relationship between conventional sperm parameters and motile sperm organelle morphology examination (MSOME). *Int J Androl* 2012; 35(4): 491–498. doi: 10.1111 / j.1365-2605.2012.01249.x.
10. Komiya A, Watanabe A, Kawauchi Y, Fuse H. Sperm with large nuclear vacuoles and semen quality in the evaluation of male infertility. *Syst Biol Reprod Med*. 2013; 59 (1): 13–20. doi:10.3109/19396368.2012.729174.
11. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F. Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. *N Engl J Med* 2001; 345(14): 1067–1068. doi:10.1056/NEJM200110043451416.
12. Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A. Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Hum Reprod*. 2006; 21(7): 1787–1790. doi:10.1093/humrep/del049.
13. De Vos A, Van de Velde H, Bocken G, Eyllenbosch G, Franceus N, Meersdom G, Tistaert S, Vankelecom A, Tournaye H, Verheyen G. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod Biomed Online*. 2008; 17(5): 617–627. doi:10.1016/s1472-6483(10)60308-2.
14. Sermondade N, Hafhouf E, Dupont C, Bechoua S, Palacios C, Eustache F, Poncelet C, Benzacken B, Lévy R, Sifer C. Successful childbirth after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection without assisted oocyte activation in a patient with globozoospermia. *Hum Reprod*. 2011; 26: 2944–2949. doi:10.1093/humrep/der258.
15. Oliveira JB, Massaro FC, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Silva LF, Vagnini LD, Franco JG Jr. Correlation between semen analysis by motile sperm organelle morphology examination and sperm DNA damage. *Fertil Steril*. 2010; 94(5): 1937–1940. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.01.042.
16. Franco JG Jr, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Vagnini L. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: Implications for ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2008; 17(1): 42–45. doi:10.1016/s1472-6483(10)60291-x.
17. Kacem O, Sifer C, Barraud-Lange V, Ducot B, De Ziegler D, Poirot C, Wolf J. Sperm nuclear vacuoles, as assessed by motile sperm organelle morphology examination, are mostly of acrosomal origin. *Reprod Biomed Online* 2010; 20(1): 132–137. doi:10.1016/j.rbmo.2009.10.014.
18. Montjean D, Belloc S, Benkhalifa M, Dal-leac A, Ménézo Y. Sperm vacuoles are linked to capacitation and acrosomal status. *Hum Reprod*. 2012; 27(10): 2927–2932. doi:10.1093/humrep/des266.
19. Neyer A, Vanderzwalmen P, Bach M, Stecher A, Spitzer D, Zech N. Sperm head vacuoles are not affected by in-vitro conditions, as analysed by a system of sperm-microcapture channels. *Reprod BioMed Online*. 2013; 26(4):368–377. doi: 10.1016/j.rbmo.2012.11.021
20. Wilding M, Coppola G, di Matteo L, Palagiano A, Fusco E, Dale B. 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): 253–262. doi:10.1007/s10815-010-9505-5

21. Boitrelle F, Ferfour F, Petit JM, Segretain D, Tourain C, Bergere M, Bailly M, Vialard F, Albert M, Selva J. Large human sperm vacuoles observed in motile spermatozoa under high magnification: Nuclear thumbprints linked to failure of chromatin condensation. *Hum Reprod.* 2011; 26(7): 1650–1658. doi:10.1093/humrep/der129.

22. Perdrix A, Travers A, Clatot F, Sibert L, Mitchell V, Jumeau F, Macé B, Rives N. 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.

23. Agarwal A, Borges Jr A, Setti A. Non-invasive sperm selection for in vitro fertilization. Berlin: Springer, p. 113–116.

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

25. Kotwicka M, Filipiak K, Jedrzejczak P, Warchol JB. Caspase-3 activation and phosphatidylserine membrane translocation in human spermato-

zoa: is there a relationship? *Reprod Biomed Online.* 2008; 16 (5):657–63. doi:10.1016/s1472-6483(10)60479-8.

26. Lavolpe M, Lorenzi D, Greco E, Nodar F, Alvarez Sedó C. Relationship Between Sperm DNA Fragmentation and Nuclear Vacuoles. *JBRA Assist Reprod.* 2015;9(2):70–74. doi:10.5935/1518-0557.20150016.

27. Taherzadeh S, Khalili MA, Agha-Rahimi A, Anbari F, Ghazali S, Macchiarelli G. Vitriification increased vacuolization of human spermatozoa: application of MSOME technology. *J Reprod Infertil.* 2017; 18(2): 225–230.

28. Gatimel N, Leandri R, Parinaud J. Sperm vacuoles are not modified by freezing–thawing procedures. *Reprod Biomed Online.* 2013; 26(3): 240–246. doi:10.1016/j.rbmo.2012.11.019.

29. Boitrelle F, Albert M, Theillac C, Ferfour F, Bergere M, Vialard F, Wainer R, Bailly M, Selva J. Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin decondensation. *J Androl.* 2012; 33(6): 1371–1378. doi:10.2164/jandrol.112.016980.

Петрушко М.П., Павлович О.В., Пуговкін А.Ю., Коваленко І.Ф., Піняєв В.І., Юрчук Т.О. Індукція вакуолізації в сперматозоїдах чоловіків з олігоастенотератозооспермією після кріоконсервування з гліцерином і полівінілпіролідом.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Двоетапний метод з використанням проникаючого кріопротектору гліцерину є рутинним для кріоконсервування сперматозоїдів чоловіків з нормальним спермогенезом. Однак застосування даного способу заморожування у випадку олігоастенотератозооспермії (ОАТ) призводить до виникнення додаткових ушкоджень клітин і виникає необхідність у пошуку нових ефективних способах кріоконсервування. Вакуолізація сперматозоїдів, притаманна чоловічим гаметам, відіграє негативну роль, знижуючи здатність до запліднення клітин. **Мета.** Оцінка ступеня вакуолізації, індукованої в ОАТ сперматозоїдах людини після кріоконсервування двоетапним методом з використанням гліцерину та полівінілпіролідону (ПВП), молекулярною масою 360000. **Методи.** Виділену фракцію сперматозоїдів поділяли на 3 групи: група I – нативні сперматозоїди, II – сперматозоїди, кріоконсервовані з 10% розчином гліцерину, група III – кріоконсервовані з 10% ПВП. **Результати.** В групі I близько 5% сперматозоїдів містили вакуолі. У групі II кількості сперматозоїдів з однією дрібною вакуоллю збільшилася до $(19,68 \pm 2,27)\%$. А в групі III кількість клітин без вакуолей було порівняно з нативними сперматозоїдами: $95,59 \pm 1,59$ і $(96,09 \pm 2,02)\%$ відповідно. **Підсумок.** Таким чином, використання проникаючого кріопротектору гліцерину в концентрації 10% для двоетапного кріоконсервування сперматозоїдів людини ініціює утворення вакуолей, в той час як застосування непроникаючої ПВП дозволяє запобігти вакуолізації.

Ключові слова: сперматозоїд, кріоконсервування, вакуолізація.

Петрушко М.П., Павлович Е.В., Пуговкин А.Ю., Коваленко И.Ф., Пиняев В.И., Юрчук Т.О. Индукция вакуолизации в сперматозоидах мужчин с олигоастенотератозооспермией после криоконсервирования с глицерином и поливинилпирролидоном.

РЕФЕРАТ. Актуальность. Двухэтапный метод с использованием проникающего криопротектора глицерина является рутинным для криоконсервирования сперматозоидов мужчин с нормальным спермогенезом. Однако применение данного способа замораживания в случае олигоастенотератозооспермии (ОАТ) приводит к возникновению дополнительных поврежденных клеток и возникает необходимость в поиске новых эффективных способах криоконсервирования. Вакуолизация сперматозоидов, присущая мужским гаметам, играет отрицательную роль, снижая оплодотворяющую способность клеток. **Цель.** Оценка степени вакуолизации, индуцируемой в ОАТ сперматозоидах человека после криоконсервирования.

ния двухэтапным методом с использованием глицерина и поливинилпирролидона (ПВП), молекулярной массой 360000. **Методы.** Выделенную фракцию сперматозоидов разделяли на 3 группы: группа I – нативные сперматозоиды, II – сперматозоиды, криоконсервированные с 10% раствором глицерина, группа III – криоконсервированные с 10% ПВП. **Результаты.** В группе I около 5% сперматозоидов содержали вакуоли. В группе II количества сперматозоидов с одной мелкой вакуолью увеличилось до $(19,68 \pm 2,27)\%$. А в группе III количество клеток без вакуолей было сравнимо с нативными сперматозоидами: $95,59 \pm 1,59$ и $(96,09 \pm 2,02)\%$ соответственно. **Заключение.** Таким образом, использование проникающего криопротектора глицерина в концентрации 10% для двухэтапного криоконсервирования сперматозоидов человека инициирует образование вакуолей, в то время как применение непроникающего ПВП позволяет предотвратить вакуолизацию.

Ключевые слова: сперматозоиды, криоконсервирование, вакуолизация.