

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ НА ЭМБРИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ В ПРОГРАММАХ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Крутова В. А.^{1,2}, Коваленко Я. А.², Рязанцев И. И.², Трунян Д. Г.², Малько А. В.²

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, 350063, ул. им. Митрофана Седина, 4, Краснодар, Россия

²Клиника федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Зиповская, д. 4/1, д.4/3, г. Краснодар, 350010 Россия

Для корреспонденции: Рязанцев Иван Игоревич, эмбриолог, Клиника федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, e-mail: huntot@mail.ru

For correspondence: Ivan I. Ryazantsev, embryologist, Kuban State Medical University Clinic, e-mail: huntot@mail.ru

Information about authors:

Krutova V. A., <https://orcid.org/0000-0002-9907-7491>

Kovalenko Y. A., <https://orcid.org/0000-0001-6268-9374>

Ryazantsev I. I., <https://orcid.org/0000-0002-7424-6519>

Trunyan D. G., <https://orcid.org/0000-0002-7096-0029>

Malko A. V., <https://orcid.org/0000-0001-8604-0780>

РЕЗЮМЕ

По разным данным использование криоконсервированной спермы в программах вспомогательных репродуктивных технологий не влияет на качественные показатели эмбрионов или влияет отрицательно. Цель исследования - проанализировать влияние криоконсервированной спермы, используемой в программах вспомогательных репродуктивных технологий, на эмбриологические показатели в сравнении с нативной спермой. Данное исследование проведено в клинике Кубанского государственного медицинского университета Минздрава РФ с 2015 по 2020 гг. В него включены 306 пациентов, проходивших лечение бесплодия с использованием методов вспомогательных репродуктивных технологий. Пациенты были распределены на четыре группы. Группа 1. Пациенты с патоспермией, которым проводилось лечение с применением криоконсервированного эякулята. Группа 2. Пациенты с патоспермией, которым проводилось лечение с применением свежего эякулята, полученного в день оплодотворения. Группа 3. Пациенты с нормоспермией, которым проводилось лечение с применением криоконсервированного эякулята. Группа 4. Пациенты с нормоспермией, которым проводилось лечение с применением свежего эякулята, полученного в день оплодотворения. В исследовании оценивались следующие показатели: процент правильного оплодотворения; процент эмбрионов хорошего качества на третьи сутки развития; процент бластуляции эмбрионов на пятые-шестые сутки развития; процент эмбрионов хорошего качества на пятые-шестые сутки; процент пациентов, у которых была произведена криоконсервация эмбрионов.

Исследуемые показатели у всех групп пациентов не имели статистического различия, за исключением процента эмбрионов хорошего качества на пятые-шестые сутки развития, который был выше в группе пациентов с нормоспермией с криоконсервированным эякулятом в сравнении с группой пациентов с нормоспермией со свежим эякулятом.

Использование криоконсервированной спермы при лечении не оказывает влияния на эмбриологические показатели в сравнении с использованием свежей спермы, независимо от наличия патоспермии или нормоспермии.

Ключевые слова: криоконсервация, эякулят, сперма, ВРТ (вспомогательные репродуктивные технологии), нормоспермия, патоспермия, качество эмбрионов, бластуляция, оплодотворение.

ANALYSIS OF THE EFFECT OF CRYOPRESERVED SPERM ON EMBRYOLOGICAL PARAMETERS IN ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY PROGRAMS

Krutova V. A.^{1,2}, Kovalenko Y. A.², Ryazantsev I. I.², Trunyan D. G.², Malko A. V.²

¹ Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

² Kuban State Medical University Clinic, Krasnodar, Russia

SUMMARY

According to various sources, using of cryopreserved sperm in programs of assisted reproductive technologies does not affect the quality indicators of embryos, or affects it negatively. Objective of research is to analyze the effect of cryopreserved sperm used in programs of assisted reproductive technologies on embryological parameters, in comparison to fresh sperm. This research was conducted in Kuban State Medical University Clinic of the Ministry of Health of the Russian Federation. It included 306 patients who received infertility treatment using assisted reproductive technologies. The patients were divided into four groups.

Group 1. Patients with pathospermia who received treatment using cryopreserved ejaculate. Group 2. Patients with pathospermia who received treatment using fresh ejaculate obtained on the day of fertilization. Group 3. Patients with normospermia who received treatment using cryopreserved ejaculate. Group 4. Patients with normospermia who received treatment using fresh ejaculate obtained on the day of fertilization. The study evaluated the following indicators: the percentage of correct fertilization, the percentage of good-quality embryos on the third day of development, the percentage of embryo blastulation on the fifth-sixth day of development, the percentage of good-quality embryos on the fifth-sixth day of development, the percentage of patients who underwent embryo cryopreservation. The studied parameters in all groups of patients did not have a statistical difference, except for the percentage of good-quality embryos on the fifth-sixth day of development, which was higher in the group of patients with cryopreserved ejaculate in normospermia compared to the group in which fresh ejaculate was used in normospermia. The use of cryopreserved sperm in the treatment of infertility does not affect the embryological parameters, compared with the use of fresh sperm, whatever its the pathospermia or normospermia.

Key words: cryopreservation, ejaculate, sperm, ART (assisted reproductive technologies), normospermia, pathospermia, embryo quality, blastulation, fertilization.

На сегодняшний день криоконсервация спермы стала неотъемлемой частью работы эмбриологов, хотя сравнительно недавно мало кто себе представлял, что такое возможно. Первые положительные результаты использования замороженной спермы человека были зафиксированы в 50-х годах XX века [1].

Криоконсервация спермы даёт возможность проводить программы вспомогательных репродуктивных технологий (далее – ВРТ) в тех случаях, когда использование свежей спермы у определенных групп пациентов не представляется возможным.

В соответствии с Клиническими рекомендациями (протокол лечения) «Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация» (2019 г.) криоконсервация спермы используется в следующих случаях:

- необходимость хранения половых клеток с целью дальнейшего использования при лечении бесплодия с применением ВРТ;
- необходимость хранения половых клеток до начала проведения химиотерапии и/или лучевой терапии у онкологических больных;
- необходимость хранения донорских половых клеток для использования при лечении бесплодия в программах ВРТ;
- хранение половых клеток, эмбрионов и/или тканей репродуктивных органов по желанию пациента.

Вопрос криоконсервации спермы в клинической практике наиболее актуален для пациентов с мужским бесплодием, так как у данных пациентов наблюдается снижение количественных и качественных показателей спермограммы в сравнении с пациентами с нормоспермией [2].

Исследование использования в ВРТ спермы, полученной хирургическим путем, не дало однозначных результатов о преимуществе применения свежей спермы над криоконсервированной [1]. При оплодотворении методом ИКСИ с использо-

ванием криоконсервированных сперматозоидов, полученных хирургическим путем у мужчин с абструктивной азооспермией, частота наступления беременности аналогична таковой при использовании свежих сперматозоидов [3].

Выводы о влиянии криопротекторов, содержащихся в средах для заморозки спермы, на качественные и количественные показатели размороженного эякулята неоднозначны. Так, по одним данным исследователи утверждают, что криоконсервация спермы не влияет на качество, морфологию и физиологический статус эякулята, что позволяет применять эту процедуру практически для всех групп пациентов наравне с нативным материалом без снижения качества и эффективности программ ВРТ [4]. Однако есть данные, согласно которым, процедура замораживания и размораживания спермы является сильнейшим стрессом. В результате этого стресса может происходить изменение морфологии и жизнеспособности сперматозоидов, что влечет за собой снижение способности к оплодотворению. Также авторами зафиксировано, что при оттаивании эякулята наблюдается уменьшение количества активноподвижных сперматозоидов более чем в 1,5 раза в сравнении с показателями нативной спермы [5]. Достаточно важным критерием для оплодотворения является степень фрагментации ДНК непосредственно после разморозки. Влияние криопротектора на этот показатель незначительно, однако в течении суток после разморозки наблюдается резкое увеличение доли фрагментации ДНК [6].

Для того, чтобы минимизировать или вовсе исключить негативное влияние криопротекторов на сперматозоиды, исследователями были предприняты попытки замораживать сперму методом витрификации, основанном на сверхбыстром замораживании материала, при котором вода застывает без формирования кристаллов льда [7].

Одним из неблагоприятных факторов, который может привести к ухудшению результатов при использовании размороженного эякулята,

является его длительное хранение. Так как состав и температура жидкого азота не исключают возможность перекрестной контаминации, то невозможно гарантировать биологическую безопасность образцов [8]. Однако срок хранения никак не влияет на способность сперматозоидов к оплодотворению ооцитов [9]. Сверхнизкая температура азота -196°C способствует приостановлению в половых клетках всех биохимических процессов, что позволяет хранить их длительное время [5].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Данное ретроспективное когортное исследование проводилось в дневном стационаре вспомогательных репродуктивных технологий Клиники ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

В него были включены 306 семейных пар и пациенток, получавших лечение бесплодия методами ВРТ в 2015–2020 гг.

Критериями включения были: лечение бесплодия методами ВРТ в стимулированных циклах ЭКО с применением свежего или криоконсервированного эякулята; циклы с оплодотворением методом ИКСИ.

Критериями исключения были: лечение бесплодия методами ВРТ в естественном цикле; лечение бесплодия с применением внутриматочной инсеминации; циклы с применением эякулята, транспортированного из других клиник (за исключением донорской спермы); циклы с оплодотворением методом ЭКО.

Пациенты были разделены на четыре группы:

Группа 1. 40 случаев. Пациенты с патоспермией, которым проводилось лечение бесплодия с применением криоконсервированного эякулята. В эту группу также включались пациенты, у которых сперматозоиды были получены хирургическим путем.

Группа 2. 50 случаев. Пациенты с патоспермией, которым проводилось лечение бесплодия с применением свежего эякулята, полученного в день оплодотворения.

Группа 3. 106 случаев. Пациенты с нормоспермией, которым проводилось лечение бесплодия с применением криоконсервированного эякулята. В эту группу также включались пациенты, у которых лечение бесплодия проводилось с применением донорской спермы.

Группа 4. 110 случаев. Пациенты с нормоспермией, которым проводилось лечение бесплодия с применением свежего эякулята, полученного в день оплодотворения.

Для сравнения группы объединялись по признаку наличия патоспермии, либо нормоспермии и сравнивались показатели криоконсервированного и свежего эякулята.

К образцам с патоспермией относили эякулят, который в день оплодотворения имел показатели ниже минимальных критериев, установленных Руководством ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека, пятое издание (World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen - 5th ed.): общая концентрация сперматозоидов 15 млн/мл и более, количество активноподвижных сперматозоидов 32% и более, морфология сперматозоидов по строгим критериям Крюгера 4% и более.

Для криоконсервации эякулята использовалась среда Sperm Freeze FertiPro (Бельгия) с применением протокола заморозки, рекомендованного производителем (в случае, если эякулят был криоконсервирован в Клинике ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России). Эякулят криоконсервировался в криовиалах. Оттаивание эякулята проводилось также в соответствии с рекомендациями производителя среды для криоконсервации. Обработка спермы после размораживания проводилась методом центрифугирования в градиентах плотности.

В группах 1 и 2 пациентки имели диагноз «Женское бесплодие, связанное с мужскими факторами» (код МКБ-10 N97.4). В группах 3 и 4 пациентки имели диагноз «Женское бесплодие трубного происхождения» (код МКБ-10 N97.4).

Все зрелые яйцеклетки оплодотворены методом инъекции сперматозоида в цитоплазму ооцита (ИКСИ). Оплодотворение оценивали через 18–20 часов. Эмбрионы перенесены в полость матки на 3 или 5 сутки в количестве 1 или 2. Криоконсервация эмбрионов проводилась на 5 или 6 сутки.

В исследовании оценивались следующие показатели:

1. Процент правильного оплодотворения (2PN, 2PB) от количества полученных зрелых ооцитов.
2. Процент эмбрионов хорошего качества на третьи сутки развития. Эмбрионами хорошего качества считались эмбрионы с количеством бластомеров от 6 до 10 и качеством А или В.
3. Процент бластуляции эмбрионов на пятые-шестые сутки развития. Эмбрионами с бластуляцией считались эмбрионы на стадии BL1 и выше.
4. Процент эмбрионов хорошего качества на пятые-шестые сутки развития. Эмбрионами хорошего качества считались эмбрионы на стадии BL2 и выше, пригодные для криоконсервации, с качеством AA, AB, BA, BB, AC (в соответствии с системой оценки качества морфологии, предложенной D.K.Gardner et al. [10]).

5. Процент пациентов, у которых была произведена криоконсервация эмбрионов.

В случае, если перенос эмбрионов проводился на 3 день или на 5 день, но эмбрионы не достигли стадии бластоцисты, то процент бластуляции и процент эмбрионов хорошего качества на пяты-шестые сутки развития считался в отношении эмбрионов, оставшихся после переноса.

Статистический анализ данных проведен с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена, критерии Манна-Уитни, Пирсона Хи-квадрат, максимум правдоподобия Хи-квадрат. $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В таблице 1 представлено сравнение исследуемых параметров у пациентов с патоспермией, которым проводилось лечение бесплодия с применением криоконсервированного и свежего эякулята. Из анализа результатов видно, что все показатели, кроме процента бластуляции эмбрионов, выше в группе, где использовался для оплодотворения свежий эякулят. Процент бластуляции эмбрионов незначительно больше в группе, в которой для оплодотворения использовался криоконсервированный эякулят. Однако, все различия в исследуемых параметрах не являются статистически значимыми ($p > 0,05$).

Таблица 1

Сравнение групп пациентов с патоспермией с криоконсервированным и свежим эякулятом

Исследуемый параметр	Группа 1 Криоконсервированный эякулят, патоспермия (n=40), %	Группа 2 Свежий эякулят, патоспермия (n=50), %	Показатель, p
Правильное оплодотворение	65,2	68,3	0,09
Эмбрионы хорошего качества на третьи сутки развития	62,7	68,9	0,12
Бластуляция эмбрионов на пяты-шестые сутки развития	46,6	46,1	0,72
Эмбрионы хорошего качества на пяты-шестые сутки развития	67,4	79,0	0,23
Пациенты, у которых была произведена криоконсервация эмбрионов	40,0	58,0	0,09

В таблице 2 представлено сравнение исследуемых параметров у пациентов с нормоспермией, которым проводилось лечение бесплодия с применением криоконсервированного и свежего эякулята. Анализ результатов показал, что процент правильного оплодотворения был выше в группе, где использовался криоконсервированный эякулят. Процент эмбрионов хорошего качества на третьи сутки развития, процент бластуляции эмбрионов на пяты-шестые сутки развития и процент пациентов, у которых была произведена криоконсервация эмбрионов, выше в группе, где использовался свежий эякулят. Различия в этих показателях статистически не значимы ($p > 0,05$). Процент эмбрионов хорошего качества на пяты-шестые сутки развития выше в группе, где использовался криоконсервированный эякулят – 78,6% в сравнении с 71,8% в группе, где исполь-

зовался для оплодотворения свежий эякулят. Данное различие статистически значимо ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании мы проанализировали влияние использования криоконсервированной спермы на эмбриологические показатели в программах ВРТ в сравнении с использованием свежей спермы отдельно для групп пациентов с нормоспермией и патоспермией.

Мы убедились в отсутствии негативного влияния использования криоконсервированного эякулята на частоту оплодотворения, что подтверждают исследования авторов, которые также занимались изучением этого вопроса.

Так, в работе J Kalsi et al. показано, что среднее количество правильно оплодотворенных эмбрионов эпидидимальными сперматозоидами

Таблица 2

Сравнение групп пациентов с нормоспермией с криоконсервированным и свежим эякулятом

Исследуемый параметр	Группа 3 Криоконсервированный эякулят, нормоспермия (n=106), %	Группа 4 Свежий эякулят, нормоспермия (n=110), %	Показатель, p
Правильное оплодотворение	74,4	73,2	0,23
Эмбрионы хорошего качества на третьи сутки развития	71,0	72,1	0,18
Бластуляция эмбрионов на пятые-шестые сутки развития	49,5	50,7	0,30
Эмбрионы хорошего качества на пятые-шестые сутки развития	78,6	71,8	0,03
Пациенты, у которых была произведена криоконсервация эмбрионов	50,9	54,5	0,57

статистически не различалось в группах криоконсервированной и свежей спермы (5,1 и 6,1 соответственно, $p=0,51$). Среднее количество правильно оплодотворенных эмбрионов тестикулярными сперматозоидами было выше в группе с криоконсервированной спермой по сравнению с группой со свежей спермой (6,0 и 4,6 соответственно, $p=0,021$) [11].

В другой работе показано, что частота оплодотворения в циклах ЭКО/ИКСИ с использованием спермы, полученной хирургическим путем, составила 59,9% для криоконсервированной спермы и 53,6% при использовании свежей спермы ($p=0,04$) [4].

В исследовании D. P. A. F. Braga et al. (2015) говорится о статистически достоверном различии в проценте эмбрионов хорошего качества на 2-й и 3-й дни развития в группах криоконсервированной и свежей спермы: 54,0% и 56,6% соответственно, для второго дня развития ($p<0,001$), 49,5% и 51,2% соответственно, для третьего дня развития ($p<0,001$). Количество эмбрионов, достигших стадии бластоцисты, также было достоверно больше в группе свежей спермы - 50,7% в сравнении с группой криоконсервированной спермы - 50,3% ($p=0,019$) [12]. Эти данные сопоставимы с данными нашего исследования. Однако увеличение процента эмбрионов хорошего качества на 3-й день развития и процента бластуляции в группе свежей спермы в нашем исследовании статистически не подтверждено.

На другие эмбриологические показатели криоконсервированный эякулят также не оказывает

негативного влияния, что дает возможность широко использовать технологию криоконсервации. В настоящее время эта технология массово распространена и доступна для применения в программах ВРТ.

Высокий процент эмбрионов хорошего качества на пятые–шестые сутки развития в группе, где использовался криоконсервированный эякулят в сравнении с группой, где использовался для оплодотворения свежий эякулят, связан с тем, что в этой группе более 73% случаев – протоколы ЭКО с использованием донорской спермы, где причиной бесплодия является отсутствие полового партнера или азооспермия у партнера.

Ограничением нашего исследования является относительно небольшое количество пациентов, прошедших лечение бесплодия методами ВРТ с использованием криоконсервированного эякулята.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Независимо от наличия у пациентов патоспермии или нормоспермии использование криоконсервированной спермы при лечении бесплодия методами ВРТ не ухудшает эмбриологические показатели. Рекомендуется проводить криоконсервацию эякулята по показаниям или для удобства пациентов, так как это не оказывает отрицательного влияния на качество эмбрионов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors have no conflict of interests to declare.

ЛИТЕРАТУРА

1. Anger J. T., Gilbert B. R., Goldstein M. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. *J Urol.* 2003 Oct;170(4,Pt1):1079-84. doi: 10.1097/01.ju.0000084820.98430.b8.
2. Садретдинов Р. А., Полуниин А. А., Асфандияров Ф. Р., Воронина Л. П. Анализ показателей спермограммы у бесплодных мужчин Астраханского региона. *Кубанский научный медицинский вестник* 2015;(3):94-97. doi: 10.25207/1608-6228-2015-3-94-97.
3. Wald M., Ross L. S., Prins G. S., Cieslak-Janzen J., Wolf G., Niederberger C. S. Analysis of outcomes of cryopreserved surgically retrieved sperm for IVF/ICSI. *J Androl.* 2006 Jan-Feb;27(1):60-5. doi:10.2164/jandrol.05076.
4. Иванова О. В., Шурыгина О. В., Русаков Д. Ю., Быкова Т. В., Петрова А. А., Юхимец С. Н., Кулакова О. В., Юлдашева С. З. Оценка эффективности криоконсервации гамет и эмбрионов человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий. *Морфологические ведомости.* 2019;27(3):46-50. doi:10.20340/mv-mn.19(27).03.46-50.
5. Плосконос М. В., Терентьев А. А., Зулбалаева Д. Ф., Бондаренко С. К. Оценка способности сперматозоидов человека к апоптозу после криоконсервации спермы. *Проблемы репродукции.* 2017;23(3):90-94. doi: 10.17116/repro201723390-94.
6. Симоненко Е. Ю., Гармаева С. Б., Яковенко С. А., Григорьева А. А., Твердислов В. А., Миронова А. Г., Апрышко В. П. Влияние температуры хранения и условий криоконсервации на степень фрагментации ДНК сперматозоидов человека. *Биофизика.* 2016. Т. 61. № 2. С. 316-320. doi: 10.1134/s0006350916020184
7. Честков В. В., Беккерова Л. А., Щепкина Ю. В., Шилейко Л. В., Курило Л. Ф., Выбор среды для витрификации сперматозоидов человека. *Андрология и генитальная хирургия.* 2012;13(1):46-49.
8. Петрова Е. В., Макарова Н. П., Курило Л. Ф. Биологическая безопасность образцов (сперматозоидов, ооцитов и эмбрионов человека) при длительном хранении в жидком азоте *Андрология и генитальная хирургия.* 2013;(2):40-45.
9. Габибуллаева З. Г., Мосесова Ю. Е. Наступление беременности со сперматозоидами, полученными из криоконсервированной ткани яичка онкологического больного. *Кремлевская медицина. Клинический вестник.* 2015;(3):140-141.
10. Gardner D. K., Schoolcraft W. B., Wagley L., Schlenker T., Stevens J., Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Human Reproduction,* 1998;13:3434-3440.
11. Kalsi J., Thum M. Y., Muneer A., Pryor J., Abdullah H., Minhas S. Analysis of the outcome of intracytoplasmic sperm injection using fresh or frozen sperm. *BJU Int.* 2011 Apr;107(7):1124-8. doi:10.1111/j.1464-410X.2010.09545.x.
12. Braga D. P. A. F., Setti A. S., Figueira R. C. S., Iaconelli A., Borges E. The negative influence of sperm cryopreservation on the quality and development of the embryo depends on the morphology of the oocyte. *Andrology.* 2015;3(4):723-728. doi: 10.1111/andr.12049

REFERENCES

1. Anger J. T., Gilbert B. R., Goldstein M. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. *J Urol.* 2003 Oct;170(4 Pt 1):1079-84. doi: 10.1097/01.ju.0000084820.98430.b8.
2. Sadretdinov R. A., Polunin A. A., Asfandiyarov F. R., Voronina L. P. Analysis of spermogram in infertile men of Astrakhan region. *Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik* 2015;(3):94-97. (In Russ.). doi:10.25207/1608-6228-2015-3-94-97
3. Wald M., Ross L. S., Prins G. S., Cieslak-Janzen J., Wolf G., Niederberger C. S. Analysis of outcomes of cryopreserved surgically retrieved sperm for IVF/ICSI. *J Androl.* 2006 Jan-Feb;27(1):60-5. doi:10.2164/jandrol.05076.
4. Ivanova O., Shurygina O., Rusakov D., Bykova T., Petrova A., Yukhimets, S., Kulakova O., Yuldasheva Z. The evaluation of the efficiency of the cryopreservation of human's gametes and embryos in assisted reproductive technology program. 2019. *Morfologicheskie vedomosti.* 2019;27(3):46-50. (In Russ.). doi:10.20340/mv-mn.19(27)03.46-50.
5. Ploskonos M. V., Terentyev A. A., Zulfalaeva D. F., Bondarenko S. K. The assessment of the ability of human spermatozoa to apoptosis after cryopreservation of sperm. *Problemy reproduktsii.* 2017;23(3):90-94. doi:10.17116/repro201723390-94. (In Russ.).
6. Simonenko E. Y., Garmaeva S. B., Yakovenko S. A., Grigorieva A. A., Tverdislov V. A., Mironova A. G., Aprishko V. P. The influence of the storage temperature and cryopreservation conditions on the extent of human sperm DNA fragmentation. *Biophysics.* 2016;61(2):267-270.
7. Chestkov V. V., Bekkerova L. A., Schepkina Ju. V., Shileiko L. V., Kurilo L. F. Selection of medium for vitrification of human spermatozoa. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya.* 2012;13(1):46-49. (In Russ.).
8. Petrova Ye.V., Makarova N.P., Kurilo L. F. Biosafety samples (sperm, oocytes and embryos person) during prolonged storage in liquid nitrogen. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya.* 2013;(2):40-45. (In Russ.).

9. Gabibullaeva Z.G., Mosessova Yu.E. Pregnancy development after the injection of spermatozoa taken out of the cryopreserved testicle tissues of an oncologic patient. *Kremlevskaya meditsina. Klinicheskii vestnik*. 2015;(3):140-141. (In Russ.).
10. Gardner D. K., Schoolcraft W. B., Wagley L., Schlenker T., Stevens J., Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Human Reproduction*, 1998a;13:3434-3440.
11. Kalsi J., Thum M. Y., Muneer A., Pryor J., Abdullah H., Minhas S. Analysis of the outcome of intracytoplasmic sperm injection using fresh or frozen sperm. *BJU Int*. 2011 Apr;107(7):1124-8. doi:10.1111/j.1464-410X.2010.09545.x.
12. Braga, D. P. A. F., Setti A. S., Figueira R. C. S., Iaconelli A., Borges E. The negative influence of sperm cryopreservation on the quality and development of the embryo depends on the morphology of the oocyte. *Andrology*. 2015;3(4):723–728. doi:10.1111/andr.12049.