

УДК 612.616:57.086.13

М.Л. Панасовський

Клінічні та ембріологічні характеристики циклів лікування безпліддя з використанням свіжовиділених і криоконсервованих тестикулярних сперматозоїдів

UDC 612.616:57.086.13

M.L. Panasovsky

Clinical and Embryological Characteristics of Infertility Treatment Cycles Using Fresh and Cryopreserved Testicular Spermatozoa

Ключові слова: криоконсервування, сперматозоїди, лікування безпліддя, допоміжні репродуктивні технології.

Key words: cryopreservation, spermatozoa, infertility treatment, assisted reproductive technologies.

Азооспермія (відсутність сперматозоїдів в еякуляті) становить понад 10% від усіх випадків чоловічого безпліддя. Вона може бути викликана обструкцією в репродуктивному тракті [4], яка виявляється у чоловіків із вазектомією або запальними процесами [1, 6]. Криоконсервування хірургічно вилучених сперматозоїдів – перспективний напрямок лікування безпліддя. Цей метод дає можливість уникнути повторних операцій і використовувати спермії у декількох спробах застосування допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ). Криоконсервування хірургічно вилучених сперматозоїдів є складною процедурою, яка не дозволяє одержати достатню кількість рухливих спермій. Крім того, суспензія сперматозоїдів, отриманих із яєчок, контамінована клітинним дебрисом, еритроцитами та лейкоцитами.

На підставі вищевикладеного актуальним є пошук ефективних методів підготовки хірургічно вилучених сперматозоїдів та способів подальшого їх криоконсервування. На даний час найбільш затребуваним вважається заморожування тестикулярних сперматозоїдів без застосування криопротекторів [9] та з залученням методу вітрифікації [2].

Мета роботи – порівняння ефективності лікування безпліддя з використанням свіжовиділених та криоконсервованих сперматозоїдів, вилучених хірургічним методом у пацієнтів із обструктивною азооспермією.

Azoospermia (absence of sperm in ejaculate) accounts for more than 10% of all the cases of male infertility. It may be caused by reproductive tract obstruction [4], which is revealed in men with vasectomy or inflammatory processes [4, 6]. Cryopreservation of surgically retrieved spermatozoa is a promising direction in infertility treatment. This method makes it possible to avoid repeated surgeries and the spermatozoa may be used in several attempts of assisted reproductive technologies (ART). Cryopreservation of surgically retrieved spermatozoa is a complicated procedure, not enabling the procurement of a sufficient number of motile spermatozoa. In addition, the testes-derived spermatozoa suspension is contaminated with cell debris, erythrocytes and leukocytes.

Based on the mentioned above, the search for the efficient ways to prepare the surgically retrieved spermatozoa and their further cryopreservation is topical. The testicular spermatozoa cryoprotectant-free freezing [9], involving vitrification [1] is currently considered as the most relevant way.

The research aim was to compare the efficiency of infertility treatment with using the surgically retrieved fresh and cryopreserved spermatozoa in the patients with obstructive azoospermia.

Previously [4], we have analyzed the embryological and clinical data of ART infertility treatments using the testicular tissue-derived fresh spermatozoa (group 1, $n = 40$) and those, cryopreserved by two-

Відділення андрології, Харківський обласний клінічний центр урології та нефрології

Department of Andrology, Kharkiv Regional Clinical Center of Urology and Nephrology

Адреса для кореспонденції:

пр. Московський, 195, м. Харків, Україна 61037;
тел.: (+38 050) 184-15-20
електронна пошта: panas26031973@gmail.com

Address for correspondence:

195, Moskovsky ave., Kharkiv, Ukraine 61037;
tel.: +380 50 184 1520
e-mail: panas26031973@gmail.com

Надійшла 10.11.2019

Прийнята до друку 23.04.2020

Received November, 10, 2019

Accepted April, 23, 2020

© 2020 M.L. Panasovsky. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

У нашій попередній роботі [1] було проаналізовано ембріологічні та клінічні дані циклів лікування безпліддя за допомогою ДРТ із використанням свіжовиділених із тестикулярної тканини (група 1, $n = 40$) та кріоконсервованих за двоетапним заморожуванням (група 2, $n = 32$) сперматозоїдів. У дослідженні брали участь сімейні пари з середнім віком: жінки – ($33,7 \pm 4,1$) та ($33,8 \pm 4,1$) років, чоловіки – ($35,8 \pm 4,2$) та ($34,8 \pm 3,2$) років для груп 1 та 2 відповідно. Роботу виконували за письмової згоди пацієнтів із дотриманням етичних принципів, затверджених Гельсінською декларацією.

У чоловіків під загальним наркозом вилучали $0,5 \text{ cm}^3$ тестикулярної тканини, яку збирали в стерильну пробірку з живильним культуральним середовищем «Global total for fertilization» («LifeGlobal», США), та доставляли в ембріологічну лабораторію. За допомогою голок тканину розділяли на окремі каналці. Сперматозоїди вилучали та центрифугували 10 хв при 1300g. Концентрацію та рухливість вилучених спермій визначали під світловим мікроскопом «Olympus IX-71» («Olympus», Японія).

У якості кріозахисного середовища використовували розчин 4%-го гліцерину («Sigma», США) та 20% сироватки альбуміну людини («LifeGlobal», США). Після 15-хвилинної еквілібрації з кріозахисним середовищем вилучені клітини розміщували у кріовіалях («Thermo Fisher Scientific», США) та маркували. Зразки охолоджували від 25 до 4°C , після чого витримували 30 хв у парах рідкого азоту (до -70°C) з наступним занурюванням у рідкий азот (-196°C). Відігрів здійснювали на водяній бані при 37°C . Спермії відмивали від розчину кріопротектору шляхом одноразового центрифугування та видалення супернатанту. На преципітат нашаровували $0,1 \text{ ml}$ культивованого середовища та розміщували у CO_2 -інкубаторі до проведення інтрацитоплазматичної ін'єкції спермія в ооцит (ICSI).

Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою програми «Excel» («Microsoft», США). Для порівняння двох вибірок застосовували U-критерій Манна-Уїтні з рівнем значущості $p < 0,05$.

Після екстракції сперматозоїдів із тестикулярної тканини у пацієнтів груп 1 та 2 було отримано (836 ± 98) та (726 ± 66) клітин, із них рухливих – ($66,7 \pm 5,3$) та ($65,2 \pm 7,1$)% відповідно. Частота виживання кріоконсервованих сперматозоїдів у групі 2 склала ($68,2 \pm 7,8$)%.

Аналіз ембріологічних характеристик дозволив встановити, що частота запліднення в групі 1 становила ($84,9 \pm 3,3$), а в групі 2 – ($82,7 \pm 5,1$)%.

Середня кількість вилучених ооцитів у групах 1 та 2 становила ($8,2 \pm 1,2$) та ($7,7 \pm 0,9$)% відповідно.

stage freezing (group 2, $n = 32$). This study involved the middle-aged couples: (33.7 ± 4.1) and (33.8 ± 4.1)-year-old women, and (35.8 ± 4.2) and (34.8 ± 3.2)-year-old men for groups 1 and 2, respectively. The research was performed with the written consent of patients in accordance with the ethical principles approved by the Declaration of Helsinki.

The 0.5 cm^3 of testicular tissue was retrieved in men under general anesthesia, then collected into a sterile tube with culture medium Global® total® for fertilization (LifeGlobal, USA), and delivered to the embryology laboratory. The tissue was divided into separate tubules using needles. The spermatozoa were removed and centrifuged for 10 min at 1300g. The concentration and motility of removed spermatozoa were examined with Olympus IX-71 light microscope (Olympus, Japan).

As a cryoprotectant medium, we used 4% glycerol solution (Sigma, USA) and 20% human serum albumin (LifeGlobal, USA). After 15-min equilibration with a cryoprotectant medium, the removed cells were placed into cryovials (Thermo Fisher Scientific, USA) and labelled. The samples were cooled from 25 down to 4°C , then kept for 30 min in liquid nitrogen vapor (to -70°C), followed by immersion into liquid nitrogen (-196°C). The samples were warmed in a water bath at 37°C . Spermatozoa were washed from cryoprotectant solution by a single centrifugation and the supernatant was removed. The 0.1 ml of culture medium was layered on precipitate and placed in a CO_2 incubator until the intracytoplasmic sperm injection (ICSI) was performed.

The findings were statistically processed using Excel software (Microsoft, USA). The two samples were compared with the Mann-Whitney U-test with a significance level of $p < 0.05$.

After spermatozoa extraction from testicular tissue in patients groups 1 and 2, there were obtained (836 ± 98) and (726 ± 66) cells, among which (66.7 ± 5.3) and (65.2 ± 7.1)% were motile, respectively. The survival rate of cryopreserved spermatozoa in group 2 was (68.2 ± 7.8)%.

Analysis of embryological characteristics enabled revealing the fertilization rate to be (84.9 ± 3.3) and (82.7 ± 5.1)% in groups 1 and 2, respectively.

The average number of removed oocytes for groups 1 and 2 made (8.2 ± 1.2) and (7.7 ± 0.9)%, respectively. Their high fertilization rate indicated no effect of testicular spermatozoa cryopreservation on the ability to fertilize. Basing on the results of studying the embryo morphology to day 5 of culture, the cleavage dynamics and a high quality of embryos were determined, since more than 50% of embryos in both groups reached the blastocyst stage. For



Висока частота їх фертилізації свідчила про відсутність впливу криоконсервування тестикулярних спермій на здатність до запліднення. За результатами вивчення морфологічних характеристик ембріонів на 5-ту добу культивування визначено динаміку дроблення і високу якість ембріонів, оскільки стадії бластоцисти досягло більше 50% ембріонів в обох групах. Так, частота дроблення ембріонів до стадії бластоцисти в групах 1 та 2 становила ($65,7 \pm 5,3$) та ($70 \pm 4,4$)% відповідно. Кількість бластоцист для ембріотрансферу в групі 1 дорівнювала ($1,9 \pm 0,1$) од., а в групі 2 – ($1,5 \pm 0,2$) од. Частота настання вагітності в групі 2 (застосування криоконсервованих спермій) була вище ($64,1 \pm 3,9$)%, ніж у групі 1 (запліднення свіжоаспірованими клітинами) ($49,3 \pm 4,4$)%.

Варто зазначити, що результати досліджень циклів лікування безпліддя ICSI із застосуванням криоконсервованих спермій є суперечливими. Так, D. Braga зі співавт. [3] після аналізу морфологічних характеристик ембріонів та частоти формування бластоцист при використанні свіжовиділених та криоконсервованих тестикулярних сперматозоїдів показали негативний вплив криоконсервування на зазначені показники. M. Cocuzza та співавт. [5] вказують, що частота запліднення, дроблення та кількість клінічних вагітностей у групах із використанням свіжовиділених та криоконсервованих сперматозоїдів однакові. Отримані нами результати узгоджуються з даними B.K. Gangrade [6], який показав збільшення частоти настання вагітності після використання криоконсервованих спермій.

На сьогодні використання незрілих чоловічих гамет із придатка і тканини яєчка стає більш поширеним у клінічній практиці [7]. Тому визначення кріобіологічних характеристик сперматозоїдів, вилучених хірургічним шляхом, необхідне для розробки надійних способів криоконсервування. Зрілий сперматозоїд є кінцевим продуктом сперматогенезу, який відбувається в сім'яних каналцях. Незрілі спермії мають пройти значні морфологічні (подовження, формування акросомної ділянки та хвоста) і біохімічні (перехід ядерних білків із гістонів у протаміни) зміни для забезпечення передачі в ооцит генетичного матеріалу без порушення ДНК [8]. Відомо, що акросома зазнає структурних перебудов, які призводять до трансформації форми головки спермія, видалення прикріплених цитоплазматичних крапель, а також до зміни площі поверхні сперматозоїдів. Такі зміни в плазматичній мембрані на субклітинному рівні можуть впливати на відповідь сперматозоїдів під час криоконсервування (чутливість до холодового шоку, осмотичного стресу і проникності мембрани для води та криопротекторів). Крім того, диференціаль-

example, the cleavage rate of embryos up to blastocyst stage in groups 1 and 2 was (65.7 ± 5.3) and (70 ± 4.4)%, respectively. The number of blastocysts available for embryo transfer in groups 1 and 2 amounted (1.9 ± 0.1) and (1.5 ± 0.2) units, respectively. The frequency of pregnancy onset in group 2 (use of cryopreserved spermatozoa) was higher (64.1 ± 3.9 %) than in group 1 (fertilization with freshly aspirated cells), where it made (49.3 ± 4.4)%.

It should be noted that the findings on ICSI treatment for infertility with cryopreserved spermatozoa are contradictory. For example, D. Braga *et al.* [2] after analyzing the morphological characteristics of embryos and blastocyst formation rate when using fresh and cryopreserved testicular spermatozoa showed a negative effect of cryopreservation on the mentioned indices. M. Cocuzza *et al.* [3] demonstrated the fertilization rate, cleavage and a number of clinical pregnancies in the groups, where fresh and cryopreserved spermatozoa were used, to be equal. Our findings correlate with the data of B.K. Gangrade [5], showing an increased frequency of pregnancy onset after using cryopreserved spermatozoa.

Today, the use of immature male gametes from the epididymis and testicular tissue is becoming more common in clinical practice [7]. Therefore, the determination of cryobiological characteristics of surgically retrieved spermatozoa is necessary to design the reliable cryopreservation techniques. A mature spermatozoon is the final product of spermatogenesis, occurring in seminal tubules. Immature spermatozoa have to undergo significant morphological (elongation, formation of acrosomal region and tail) and biochemical (histone-to-protamine nuclear protein transition) changes to ensure the transfer of genetic material into oocyte without DNA disruption [8]. The acrosome is known to undergo the structural rearrangements, resulting in transformation of the sperm head shape, removal of attached cytoplasmic droplets, as well as to a change in surface area of spermatozoa. These rearrangements in plasma membrane at subcellular level may affect the spermatozoa response during cryopreservation (sensitivity to cold shock, osmotic stress and membrane permeability for water and cryoprotectants). In addition, the differential areas of spermatozoa have various sensitivity to freezing and warming, that is important for determining their cryoresistance.

The study of lipid peroxidation level, apoptosis and probable DNA damage in immature testicular spermatozoa after cryopreservation is promising.

Thus, our findings demonstrate a high survival rate of testicular spermatozoa obtained in patients with obstructive azoospermia. The control of the



ні ділянки сперматозоїдів мають різну чутливість до заморожування та відігріву, що важливо для визначення їх криорезистентності.

Перспективним є дослідження рівня перекисного окислення ліпідів, апоптозу та імовірного пошкодження ДНК у незрілих сперматозоїдах яєчок після криоконсервування.

Таким чином, результати дослідження демонструють високу частоту виживання тестикулярних сперматозоїдів, отриманих у пацієнтів із обструктивною азооспермією. Контроль основних ембріологічних параметрів дозволив зробити висновки, що після проведення ICSI криоконсервованими сперміями, вилученими з тканини яєчка, частота запліднення та темпи розвитку ембріонів *in vitro* не відрізняються від результатів ICSI свіжовиділеними сперматозоїдами. Водночас збільшується кількість ембріонів 8-клітинної стадії (в групах 1 та 2 – $(18,7 \pm 1,1)$ і $(15,3 \pm 2,1)$ % відповідно), а кількість бластоцист високої категорії якості та частота настання вагітності в групах 1 та 2 – $(45,7 \pm 3,1)$ і $(54,8 \pm 4,5)$ % відповідно.

Література

1. Лесовой ВН, Аркатов АВ, Панасовский НЛ, Щербakov РВ. Малоинвазивные методы и хирургия мужского обструктивного бесплодия. В: Урология, андрология, нефрология. Материали конференції URO 2017; 2017 5-6 жовтня; Харків, Україна. Харків; 2017. С.147.
2. An G, Zou Z, Flannigan R, et al. Outcome of oocyte vitrification combined with microdissection testicular sperm extraction and aspiration for assisted reproduction in men. *Med SciMonit.* 2018; 7(24): 1379–86.
3. Braga DP, Setti AS, Figueira RC, et al. The negative influence of sperm cryopreservation on the quality and development of the embryo depends on the morphology of the oocyte. *Andrology.* 2015; 3: 723–8.
4. Chen X, Ma Y, Zou S, et al. Comparison and outcomes of nonobstructive azoospermia patients with different etiology undergoing MicroTESE and ICSI treatments. *Transl Androl Urol.* 2019;8(4): 366–73.
5. Cocuzza M, Alvarenga C, Pagani R. The epidemiology and etiology of azoospermia. *Clinics.* 2013;68(1):15–26.
6. Gangrade BK. Cryopreservation of testicular and epididymal sperm: techniques and clinical outcomes of assisted conception. *Clinics.* 2013;68 (1): 131–40.
7. Onofre J, Baert Y, Faes K, et al. Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation. *Hum Reprod Update.* 2016; 22(6): 744–61.
8. Petrushko MP, Pavlovich EV, Pinyayev VI, et al. Apoptosis and processes of DNA fragmentation in native and cryopreserved human sperm cells at normo- and pathospermia. *Tsitol Genet.* 2017;51(4): 278–81.
9. Spis E, Bushkovskaia A, Isachenko E. Conventional freezing vs. cryoprotectant-free vitrification of epididymal (MESA) and testicular (TESE) spermatozoa: Three live births. *Cryobiology.* 2019; 90: 100–2.

main embryological parameters enabled driving conclusion that after performing the ICSI with cryopreserved spermatozoa, derived from testicular tissue, the fertilization rate and that of embryo development *in vitro* did not differ from the ICSI outcomes with fresh spermatozoa. At the same time, the number of 8-cell embryos increased (18.7 ± 1.1) and (15.3 ± 2.1) % for groups 1 and 2, respectively, and the number of high-quality blastocysts and the frequency of pregnancy onset for groups 1 and 2 made (45.7 ± 3.1) and (54.8 ± 4.5) %, respectively.

References

1. An G, Zou Z, Flannigan R, et al. Outcome of oocyte vitrification combined with microdissection testicular sperm extraction and aspiration for assisted reproduction in men. *Med SciMonit.* 2018; 7(24):1379–86.
2. Braga DP, Setti AS, Figueira RC, et al. The negative influence of sperm cryopreservation on the quality and development of the embryo depends on the morphology of the oocyte. *Andrology.* 2015; 3: 723–8.
3. Chen X, Ma Y, Zou S, et al. Comparison and outcomes of nonobstructive azoospermia patients with different etiology undergoing MicroTESE and ICSI treatments. *Transl Androl Urol.* 2019;8(4):366–73.
4. Cocuzza M, Alvarenga C, Pagani R. The epidemiology and etiology of azoospermia. *Clinics.* 2013;68(1):15–26.
5. Gangrade BK. Cryopreservation of testicular and epididymal sperm: techniques and clinical outcomes of assisted conception. *Clinics.* 2013;68 (1):131–40.
6. Lesovoy VN, Arkatov AV, Panasovsky NL, Shcherbakov RV. [Minimally invasive methods and surgery for male obstructive infertility]. In: [Urology, Andrology, Nephrology]. Proceeding of the conference URO 2017. 05–06 Oct 2017, Kharkiv, Ukraine. Kharkiv; 2015. p. 147. Russian.
7. Onofre J, Baert Y, Faes K, et al. Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation. *Hum Reprod Update.* 2016; 22(6): 744–61.
8. Petrushko MP, Pavlovich EV, Pinyayev VI, et al. Apoptosis and processes of DNA fragmentation in native and cryopreserved human sperm cells at normo- and pathospermia. *Tsitol Genet.* 2017; 51(4): 278–81.
9. Spis E, Bushkovskaia A, Isachenko E. Conventional freezing vs. cryoprotectant-free vitrification of epididymal (MESA) and testicular (TESE) spermatozoa: Three live births. *Cryobiology.* 2019;90:100–2.

