

УДК 615.361.013.11.014.41:616.697

В.В. Подуфалий*

Клинический опыт использования криоконсервированных спермиев, полученных при биопсии у пациентов с азооспермией

UDC 615.361.013.11.014.41:616.697

V.V. Podufaliy*

Clinical Case of Using Cryopreserved Spermatozoa Obtained by Biopsy in Patients with Azoospermia

Реферат: Разработанный ранее высокоэффективный метод криоконсервирования нормозооспермического эякулята был применен для единичных эпидидимальных спермиев с целью использования в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Клетки охлаждали в капиллярах с раствором 20% сахарозы и 15% глицерина от 22 до -35°C со скоростью 1 град/мин, от -35 до -70°C со скоростью 20 град/мин, а затем микрокапилляры погружали в жидкий азот. После отогрева выживаемость сперматозоидов составила 92%. Ооциты оплодотворяли микроинъекцией единичного спермия, после культивирования и оценки качества эмбрион переносили в полость матки. Частота наступления беременности после использования криоконсервированных спермиев была выше (53,1%), чем свежееаспирированных клеток (46,1%). Таким образом показана применимость использованного метода криоконсервирования в ВРТ для пациентов с азооспермией.

Ключевые слова: сперматозоиды, криоконсервирование, вспомогательные репродуктивные технологии.

Реферат: Розроблений раніше високоефективний метод криоконсервування нормозооспермічного еякуляту було застосовано для поодиноких епідидимальних спермій з метою використання в програмах допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ). Клітини охолоджували в капілярах з розчином 20% сахарози і 15% гліцерину від 22 до -35°C зі швидкістю 1 град/хв, від -35 до -70°C зі швидкістю 20 град/хв, а потім мікрокапіляри занурювали в рідкий азот. Після відігріву виживаність сперматозоїдів склала 92%. Ооцити запліднювали мікроін'єкцією поодинокого спермія, після культивування та оціювання якості ембріон переносили до порожнини матки. Частота настання вагітності після використання криоконсервованих спермій була вищою (53,1%), ніж свіжоаспірованих клітин (46,1%). Таким чином, показано придатність застосованого методу криоконсервування в ДРТ для пацієнтів з азооспермією.

Ключові слова: сперматозоїди, криоконсервування, допоміжні репродуктивні технології.

Abstract: Previously developed highly effective method for cryopreservation of normozoospermic ejaculate was applied for single epididymal spermatozoa for following using in assisted reproductive technologies (ART). The cells were cooled in microcapillaries with solution of 20% sucrose and 15% glycerol from 22 down to -35°C with rate of 1 deg/min, from -35 down to -70°C with rate of 20 deg/min and thereafter plunged into liquid nitrogen. Post-thaw survival of spermatozoa was 92%. Oocytes were fertilized by injection of single spermatozoa, the embryos were cultured, assessed for pronuclei peresence and transferred into uterus. Pregnancy rate after using cryopreserved cells was higher (53.1%) than after using fresh asperated cells (46.1%). Thus the utilized method of cryopreservation could be effectively used in ART for patients with azoospermy.

Key words: spermatozoa, cryopreservation, assisted reproductive technologies.

Одной из причин низких демографических показателей в Украине является бесплодный брак, в структуре которого мужской фактор составляет 40% [1]. В начале 90-х годов развитие репродуктивной медицины привело к возможности использования вспомогательных репродуктивных технологий с оплодотворением сперматозоидами пациентов с олигоастенотератозооспермией, а также сперматозоидами, полученными хирургическим путем у пациентов с азооспермией [2]. В настоя-

One of the causes of low demographic indices in Ukraine is an infertile couple in structure of which male factor makes 40% [1]. In the early 90s the development of reproductive medicine made possible the assisted reproductive technologies in terms of fertilization with spermatozoa of patients with azoospermia [2]. Currently the treatment of severe forms of infertility involves the following methods: MESA (microsurgical epididymal sperm aspiration); PESA (percutaneous epididymal sperm aspiration); MESE (microepididymal

Отдел криобиологии системы репродукции, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков
3-я городская больница, г. Львов

***Адрес для корреспонденции:**

ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;
тел.: (+38 057) 373-31-19, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

Department of Cryobiology of Reproduction System, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine
Third Municipal Clinical Hospital, Lviv, Ukraine

***To whom correspondence should be addressed:**

23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 373 3119, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Поступила 18.12.2012
Принята в печать 30.04.2013

Received December, 18, 2012
Accepted April, 30, 2013

щее время для лечения тяжелых форм бесплодия широко применяются такие методики: MESA (микрохирургическая эпидидимальная аспирация сперматозоидов); PESA (перкутанная эпидидимальная аспирация сперматозоидов); MESE (получение сперматозоидов при проведении открытой биопсии придатка яичка) и TESE (получение сперматозоидов при проведении открытой биопсии яичка) [4, 10, 18, 19].

Для лечения бесплодия при азооспермии мужа в большинстве случаев используют свежееаспираторированные сперматозоиды и технологию экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) с микроинъекцией единичного спермия в ооцит (ICSI) [7, 8, 20]. При этом пригодных для оплодотворения подвижных нормальных сперматозоидов может быть крайне мало, а их выделение требует больших усилий и затрат времени. Кроме того, не существует надежных дооперационных методов, гарантирующих извлечение сперматозоидов при пункции яичка и придатка яичка.

Если в силу разных причин невозможно повторно получить этот генетический материал, то выделенные единичные сперматозоиды необходимо криоконсервировать. В данном случае пациент может быть застрахован от возможного неполучения сперматозоидов непосредственно в день аспирации ооцитов супруги.

Криоконсервирование эякуляторных спермиев – стандартная процедура, и в большинстве случаев она дает высокий выход жизнеспособных клеток, а сперматозоиды, извлеченные путем биопсии, имеют после замораживания-отогрева низкое качество. Описаны лишь единичные случаи наступления беременности после ЭКО замороженно-оттаянными спермиями, полученными при obstructивной и необструктивной азооспермии [13, 14].

В настоящее время разработаны высокоэффективные методы криоконсервирования нормозооспермического эякулята, однако не выработан подход к криоконсервированию единичных эякуляторных и эпидидимальных спермиев.

Целью данного исследования явилось изучение морфофункциональных характеристик, оплодотворяющей способности и частоты наступления беременности после использования криоконсервированных единичных спермиев, полученных при MESA/PESA в программе ICSI.

Материалы и методы

У 58 супружеских пар в связи с азооспермией супруга были проведены программы ЭКО + ICSI эпидидимальными спермиями, из них у 32 (группа 1) свежееаспираторированными, 26 (группа 2) – криоконсервированными спермиями.

спем extraction, *i. e.* obtaining sperm during an open biopsy of the epididymis) and TESE (testicular sperm extraction, *i. e.* obtaining sperm during an open testicular biopsy) [4, 10, 18, 19].

To treat infertility at husband's azoospermia there are mostly used freshly aspirated spermatozoa and *in vitro* fertilization (IVF) with intracytoplasmic sperm injection (ICSI) [7, 8, 20]. Moreover the number of suitable for fertilization normal active spermatozoa may be very low, and their isolation is difficult and time-consuming. In addition there are no reliable non-surgical methods guaranteeing the extraction of spermatozoa at the puncture of epididymis and testis.

If for different reasons it is impossible to re-obtain this genetic material the isolated spermatozoa are to be cryopreserved. In this case the patient may be insured against possible non-obtaining of spermatozoa in the day of aspiration of wife's oocytes.

Cryopreservation of ejaculatory sperm cells has become a standard procedure and it gives mostly a high outcome of viable cells. However, the spermatozoa isolated by biopsy have a low quality after freezing-thawing. There are described only a few cases of pregnancy after IVF with frozen-thawed sperm obtained at obstructive and non-obstructive azoospermia [13, 14]

Currently the highly effective methods for cryopreservation of normozoospermic ejaculate have been developed, but no approach for cryopreservation of single ejaculatory or epididymal sperm has been developed.

The research aim was to study morphofunctional characteristics, fertilizing ability and frequency of pregnancies after using the cryopreserved single spermatozoa obtained at MESA/PESA with ICSI.

Materials and methods

For 58 couples wherein husband had azoospermia were performed IVF + ICSI programs with epididymal spermatozoa, among them for 32 couples (group 1) the freshly aspirated cells were used, and for 26 couples (group 2) the cryopreserved sperm was applied.

Clinical and laboratory data of women in both groups were comparable. Stimulation was done using agonists of gonadotropin-releasing hormone with initial dose of recombinant follicle-stimulating hormone of 225 IU. MESA/PESA methods were applied in the day of transvaginal follicle aspiration.

Men were andrologically examined, analysis of ejaculate, study of hormonal status, cytogenetical analysis of lymphocytes of peripheral blood were done.

When performing MESA/PESA we obtained the aspirate and placed it into Sperm Preparation Medium (Cook, Australia). If there were present any spermatozoa the aspirate was centrifuged at 900 g for 10 min.



Клинико-лабораторные данные женщин обеих групп были сопоставимы. Стимуляция проводилась с применением агонистов гонадотропин-релизинг-гормона со стартовой дозой рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона 225 МЕ. Методики MESA/PESA применялись в день трансвагинальной аспирации фолликулов.

Мужчины прошли общее андрологическое обследование: анализ эякулята, исследование гормонального статуса, цитогенетический анализ лимфоцитов периферической крови.

При проведении MESA/PESA получали аспират, который помещали в среду «Sperm Preparation Medium» («Cook», Австралия). При обнаружении сперматозоидов аспират центрифугировали при 900g 10 мин. Осадок ресуспендировали в 20 мкл среды, подсчитывали количество сперматозоидов, оценивали их морфологию и кинетическую активность (количество активно-подвижных клеток). Для криоконсервирования сперматозоидов использовали метод Г.Г. Юрченко и соавт. [3]. К суспензии сперматозоидов добавляли 20 мкл фосфатно-буферной среды с 20% сахарозы и 15% глицерина. После 15 мин эквilibрации в капилляры диаметром 100 мкм и объемом 50 мкл помещали 40 мкл раствора криопротектора с суспензией сперматозоидов. Биоматериал криоконсервировали по двухэтапной программе: от 22 до -35°C со скоростью 1 град/мин, от -35 до -70°C со скоростью 20 град/мин, затем микрокапилляры погружали в жидкий азот.

Для деконсервирования образцы помещали на водяную баню с температурой 37°C . Немедленно удаляли криопротектор путем 10-минутного центрифугирования среды при 900g. К осадку добавляли 20 мкл среды «Sperm Preparation Medium». Сперматозоиды эквilibрировали 10 мин в инкубаторе при температуре 37°C , 6% CO_2 . Выживаемость сперматозоидов после размораживания определяли как количество подвижных клеток. Для выполнения ICSI проводили селекцию спермиев по морфофункциональным характеристикам. Через 16 ч после оплодотворения регистрировали наличие пронуклеусов. Полученные эмбрионы культивировали *in vitro* в условиях 6% CO_2 , 37°C в альбумин-содержащей среде («Cook»).

Эмбрионы в полость матки переносили на 5-е сутки. Для оценки blastocист использовали классификацию D. Gardner [9].

Данные статически обрабатывали с использованием t-теста. Показатели в таблице и тексте представлены в виде среднего \pm стандартной ошибки среднего. Различия показателей считали значимыми при $p < 0,05$.

The sediment was resuspended in 20 ml of medium, the number of spermatozoa was calculated, their morphology and kinetic activity (the number of active cells) were assessed. To cryopreserve the sperm we used the method of Yurchenko *et al.* [3]. Sperm suspension was supplemented with 20 ml phosphate buffer medium with 20% sucrose and 15% glycerol. After 15 min equilibration the capillaries of 100 mm diameter and 50 ml volume were filled with 40 ml cryoprotectant solution mixed with sperm suspension. Biological material was cryopreserved by two-step program: from 22 down to -35°C with 1 deg/min rate, from -35 down to -70°C with the rate of 20 deg/min, then the microcapillaries were plunged into liquid nitrogen.

For thawing the samples were placed in water bath at 37°C . The cryoprotectant was immediately removed by 1 minute long centrifugation of the sample at 900g. The sediment was resuspended in 20 μl of Sperm Preparation Medium. The spermatozoa were incubated during 10 min at 37°C and 6% CO_2 . The survival of spermatozoa after thawing was determined as a number of active cells with a normal structure. To perform ICSI we selected the spermatozoa by morphofunctional characteristics. In 16 hours after fertilization we checked the presence of pronuclei. The obtained embryos were *in vitro* cultured in albumin-containing medium (Cook, Australia) at 6% CO_2 , 37°C .

Embryos were transferred into uterine cavity to the 5th day. Classification of Gardner was used to assess blastocysts [9].

The data were statistically processed with t-test. The indices in table and text were presented as a mean \pm standard error of the mean. The differences of indices were considered as significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

The using of native and cryopreserved epididymal spermatozoa was the formation criterion of the studied groups. Herewith the distribution of females in the groups by age was identical in the groups 1 and 2: 30.0 ± 6.2 and 31.7 ± 3.4 years, respectively. Woman age is an important prognostic factor of efficiency of assisted reproductive technologies and must be considered at randomization of the studied groups.

During follicle aspiration there were procured 202 oocytes in the group 1 and 177 in the group 2. No significant differences in average number of aspirated oocytes in the groups 1 and 2 groups were found (Table), *i.e.* the results of ovary stimulation in the studied patients were comparable.

An average number of spermatozoa in aspirates of the men of the groups 1 and 2 was comparable as well (see Table). The studying of morphofunctional characteristics of epididymal spermatozoa showed a signifi-



Результаты и обсуждение

Критерием формирования исследуемых групп было использование свежееаспирированных и криоконсервированных эпидидимальных спермиев. При этом распределение групп по возрасту женщин-партнеров было тождественным: $30,0 \pm 6,2$ и $31,7 \pm 3,4$ года в группах 1 и 2 соответственно. Возраст женщин является важным прогностическим фактором эффективности вспомогательных репродуктивных технологий и должен учитываться при рандомизации исследуемых групп.

При аспирации фолликулов было выделено 202 ооцита в группе 1 и 177 – в группе 2. Различия среднего количества аспирированных ооцитов в группах 1 и 2 были незначимыми (таблица), т. е. результаты стимуляции яичников у исследуемых пациенток были сопоставимыми.

Среднее количество спермиев в аспиратах мужчин групп 1 и 2 было также сопоставимо (см. таблицу). Исследование морфофункциональных характеристик эпидидимальных спермиев показало значительное снижение общего количества спермиев и активно-подвижной фракции по сравнению с нормозооспермическими эякулятами (данные ВОЗ по нормозооспермии – 50% [23]). Так, количество активно-подвижных спермиев в группе 1 составило $12 \pm 0,8$, в группе 2 – $8 \pm 0,8\%$. После замораживания сперматозоиды хранили в жидком азоте от месяца до года. Выживаемость спермиев после отогрева составила $92 \pm 8,8\%$.

После отогрева, удаления криопротектора и инкубации отбирали подвижные сперматозоиды с нормальным строением и проводили оплодотворение ооцитов с помощью ICSI. Высокая частота фертилизации ооцитов (см. таблицу) свидетельствовала о том, что криоконсервирование тестикулярных спермиев не влияло на их оплодотворяющую способность. Изучение морфологических характеристик эмбрионов на 5-е сутки культивирования показало наличие динамики дробления и высокое качество эмбрионов, поскольку стадии бластоцист достигло более 50% эмбрионов в обеих группах. Частота наступления беременности в группе с применением криоконсервированных спермиев была выше (53,1%), чем в группе с оплодотворением свежееаспирированными клетками (46,1%).

Следует отметить, что результаты исследований циклов лечения бесплодия методом ICSI с применением криоконсервированных эпидидимальных

Параметры ICSI/MESA/PESA циклов при использовании свежееаспирированных и криоконсервированных спермиев
Parameters of ICSI/MESA/PESA cycles with fresh or frozen-thawed sperm

Параметры Parameters	Свежееаспирированные спермии (группа 1) Fresh sperm (Group 1)	Криоконсервированные спермии (группа 2) Frozen-thawed sperm (Group 2)
Число супружеских пар Number of married couples	32	26
Возраст пациенток, лет Age of females, years	$30,0 \pm 6,2$	$31,7 \pm 3,4$
Среднее (общее) количество аспирированных ооцитов в цикле Average (total) number of aspirated oocytes in a cycle	$6,3 \pm 1,0$ (202)	$6,8 \pm 1,6$ (177)
Среднее количество спермиев Average number of spermatozoa	$178,9 \pm 16,2$	$171,2 \pm 18,6$
Среднее (общее) количество ооцитов на стадии M II Average (total) number of oocytes at MII stage	$6,2 \pm 0,9$ (199)	$6,3 \pm 0,9$ (165)
Среднее (общее) количество инъецированных ооцитов Average (total) number of treated oocytes	$6,2 \pm 0,9$ (199)	$6,3 \pm 0,9$ (165)
Частота фертилизации, % Fertilization rate, %	$94,8 \pm 7,8$	$96,9 \pm 6,6$
Частота дробления, % Cleavage rate, %	$98,1 \pm 5,1$	$98,35 \pm 4,6$

сpearms reduction of total number of spermatozoa and active motile fraction if compared with normozoospermic ejaculates (the WHO standard for normozoospermia is 50% [23]). Specifically, the number of active motile spermatozoa in the group 1 group was 12 ± 0.8 , and in the group 2 it made $(8 \pm 0.8)\%$. After freezing the spermatozoa were stored in liquid nitrogen during period of one month to one year. Survival of spermatozoa after freeze-thawing made $(92 \pm 8.85)\%$.

After freeze-thawing, removing of cryoprotectant and incubation the motile spermatozoa with normal acrosome were selected and oocytes fertilization was performed by ICSI. A high rate of oocytes fertilization (Table) testified to the fact that cryopreservation of testicular spermatozoa did not affect their fertilizing ability. Assessment of morphological characteristics of embryos to the 5th culture day revealed the ongoing cleavage and a high quality of embryos, since blastocyte stage was achieved in more than 50% of embryos in both groups. Pregnancy in the group where cryopreserved spermatozoa were used was higher (53.1%) than in the group where fertilization was done with fresh aspirated cells (46.1%).

It should be noted that the reported results of infertility treatment cycles by ICSI with cryopreserved

спермиев зачастую противоречивы. Наши результаты согласуются с данными многих исследователей, которые продемонстрировали увеличение частоты наступления беременности при использовании криоконсервированных эпидидимальных спермиев [5, 6, 11, 12, 17]. Tournaye Н. и соавт. показали генетическую безопасность криоконсервирования эпидидимальных сперматозоидов: частота оплодотворения криоконсервированными спермиями не отличалась от показателя после использования свежееаспирированных клеток (75,67 и 76,49%), количество эмбрионов хорошего качества составило 64,96 и 66,09%, частота наступления беременности – 55,21 и 57,22% [21].

По данным L. Gin и соавт. [13] частота наступления беременности у пациентов после процедур с применением криоконсервированных эпидидимальных спермиев не отличалась от таковой в случае свежееаспирированных клеток.

Известны единичные сообщения о существенной доле спонтанных абортос после выполнения MESE/ICSI (25,7%) и TESE/ICSI (31,6%) [6], что можно объяснить высокой частотой хромосомных аномалий у мужчин как с обструктивной, так и необструктивной азооспермией [12]. По данным Munne S. и соавт. [15] частота рождения детей с хромосомными аномалиями у мужчин с азооспермией в 10 раз выше по сравнению с нормоспермией.

В работе Westlander G. и соавт. [22] представлены результаты проведения ICSI с криоконсервированными спермиями, полученными при перкутанной биопсии яичка. Авторы сделали вывод о необходимости изучения состояния генетического аппарата спермиев после криоконсервирования.

Были проанализированы результаты лечения 493 супружеских пар после проведения процедуры ICSI криоконсервированными спермиями, полученными методами TESE, MESA, MESE, PESA. Частота наступления беременности у пациенток после оплодотворения ооцитов криоконсервированными спермиями, независимо от метода их получения, была выше, чем в случае свежееаспирированных клеток [11, 13, 14, 16].

Silber S. и соавт. провели ретроспективное исследование 156 циклов ICSI с применением криоконсервированных спермиев и установили, что уровень активации эмбрионального генома, оцененный по частоте 8-клеточного блока развития и скорости морфогенеза, не отличался после использования криоконсервированных спермиев по сравнению с клетками, не подвергавшимися замораживанию-отогреву [19].

Таким образом, криоконсервирование спермиев незаменимо при тяжелом мужском бесплодии. Данный метод позволяет уменьшить число хирур-

epididymal spermatozoa are often contradictory. Our results are agreed with the data of many researchers, who presented the increasing of pregnancy rate when using cryopreserved epididymal spermatozoa [5, 6, 11, 12, 17]. Tournaye *et al.* reported genetic safety of cryopreservation of epididymal spermatozoa: fertilization rate of cryopreserved spermatozoa did not differ from that after using fresh aspirated cells (75.67 and 76.49%), a number of embryos of a high quality made 64.96 and 66.09%, pregnancy rate was 55.21 and 57.22%, correspondingly [21].

According to the data of Gin *et al.* [13] the pregnancy rate in the patients after the procedures, where cryopreserved epididymal spermatozoa were used, did not differ from that in the case of fresh aspirated cells.

There are single reports about significant rate of spontaneous abortions after performing MESE/ICSI (25.7%) and TESE/ICSI (31.6%) [6], that may be explained by a high frequency of chromosomal abnormalities in men both with obstructive and nonobstructive azoospermia [12]. According to the data of Manne *et al.* [15] the frequency of birth defects caused by chromosomal abnormalities in men with azoospermia is 10 times higher if compared with men with normospermia.

Westlander *et al.* [22] reported the results of ICSI with cryopreserved spermatozoa, obtained at percutaneous biopsy of testes. The authors pointed to the necessity of assessing the state of spermatozoa genetic apparatus after cryopreservation.

Analysis of treatment outcome in 493 married couples after ICSI with cryopreserved spermatozoa, procured by TESE, MESA, MESE and PESA allowed to conclude that pregnancy rate in patients after fertilization of oocytes with cryopreserved spermatozoa independently of the method of their procurement was higher than in the case of fresh aspirated cells [11, 13, 14, 16].

Silber *et al.* performed retrospective study of 156 cycles of infertility treatment by ICSI with cryopreserved spermatozoa and found that activation level of embryonic genome assessed by frequency of 8-cell stage development arrest and morphogenesis rate did not differ after using cryopreserved spermatozoa if compared with the cells, not exposed to freeze-thawing [19].

Thus, spermatozoa cryopreservation is essential at severe male infertility. This method enables to reduce a number of surgeries, avoid complications and expenses on repeated surgeries as well as to select optimal moment for assisted fertilization.

We found that the method previously developed for ejaculatory spermatozoa [3], might be used for single epididymal spermatozoa. Outcome of procedures of assisted reproductive technologies using cryopreserved



гических вмешательств, избежать осложнений и расходов, связанных с повторными хирургическими операциями, а также выбрать оптимальный момент для проведения процедуры программированного зачатия.

Мы установили, что метод, разработанный ранее для эякуляционных спермиев [3], может применяться для единичных эпидидимальных сперматозоидов. Исход процедур вспомогательных репродуктивных технологий с использованием криоконсервированных клеток (частота оплодотворения ооцитов, темпы дробления и качество эмбрионов, частота наступления беременности) существенно не отличается от результатов, полученных после использования свежееаспирированных сперматозоидов. Таким образом, аспирированные сперматозоиды могут быть успешно криоконсервированы, а их использование обеспечивает эффективное лечение бесплодия методом ICSI.

Выводы

Можно заключить, что проведение ICSI сперматозоидами, полученными в результате MESA/PESA, является эффективным при азооспермии. Метод криоконсервирования, разработанный ранее для эякуляторных сперматозоидов пациентов с нормоспермией, может успешно применяться для единичных спермиев, позволяет добиться их высокой выживаемости и не оказывает отрицательного влияния на оплодотворяющую способность и дальнейшее развитие эмбрионов *in vitro*.

Литература

1. Лечение женского и мужского бесплодия. Вспомогательные репродуктивные технологии / Под ред. В.И. Кулакова, Б.В. Леонова, Л.Н. Кузьмичева. – М.: Мед. информ. агентство, 2005. – 592 с.
2. Хилькевич Л.В., Здановский В.М., Тогобетский С., Гоголевский П.А. Вспомогательные репродуктивные технологии (PESA и MESA) при лечении бесплодия, обусловленного мужским фактором // Проблемы репродукции. – №2. – 1998. – С. 29–33.
3. Юрченко Г.Г., Дунаевская А.В., Крамар М.И. Влияние метода выделения подвижной фракции гамет из эякулята человека на их морфофункциональную сохранность после криоконсервирования // Проблемы криобиологии. – 2001. – №2. – С. 30–35.
4. Craft I., Bennet V., Nicholson N. Fertilising ability of testicular spermatozoa // Lancet. – 1993. – Vol. 2, № 342. – С. 864.
5. Craft I., Tsirigotis M. Simplified recovery, preparation and cryopreservation of testicular spermatozoa // J. Hum. Reprod. – 1995. – Vol. 10, №7. – P. 1623–1627.
6. Desai N., AbdelHafez F., Sabanegh E. Paternal effect on genomic activation, clinical pregnancy and live birth rate after ICSI with cryopreserved epididymal versus testicular spermatozoa // Reprod. Biol. Endocrinol. – 2009. – Vol. 3, №7. – P. 142–149.

cells (oocytes fertilization rate, division rate, pregnancy rate) did not significantly differ from the results, obtained after using fresh aspirated spermatozoa. Therefore, aspirated spermatozoa may be successfully cryopreserved and their using provides an effective infertility treatment by ICSI.

Conclusions

We may conclude that performing ICSI with spermatozoa, obtained by MESA/PESA is effective for azoospermia. Cryopreservation method previously developed for ejaculatory spermatozoa of the men with normospermia may be successfully used for single spermatozoa, enables to achieve their high survival and does not negatively affect fertilizing capacity and further *in vitro* development of embryos.

References

1. Treatment of female and male infertility. Assisted reproductive technologies / Ed. by Kulakov V.I., Leonov B.V., Kuzmichev L.N. – Moscow: Med. Inform. Agenstvo, 2005. – 592 p.
2. Khilkevich L.V., Zdanovsky V.M., Togobetsky S., Gogolevsky P.A. Additional reproductive technologies (PESA and MESA) at infertility treatment stipulated by male factor // Problemy Reproduktsii. – 1998. – N2. – P. 29–33.
3. Yurchenko G.G., Dunaevskaya A.V., Kramar M.I. Effect of derivation method of motile fractions of gametes from human ejaculate on their morphofunctional integrity after cryopreservation // Problems of Cryobiology. – 2001. – №2. – P. 30–35.
4. Craft I., Bennet V., Nicholson N. Fertilising ability of testicular spermatozoa // Lancet. – 1993. – Vol. 2, N342. – C. 864.
5. Craft I., Tsirigotis M. Simplified recovery, preparation and cryopreservation of testicular spermatozoa // J. Hum. Reprod. – 1995. – Vol. 10, N7. – P. 1623–1627.
6. Desai N., AbdelHafez F., Sabanegh E. Paternal effect on genomic activation, clinical pregnancy and live birth rate after ICSI with cryopreserved epididymal versus testicular spermatozoa // Reprod. Biol. Endocrinol. – 2009. – Vol. 3, N7. – P. 142–149.
7. Devroey P., Liu J., Nagy Z. et al. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection (TESE and ICSI) // Fertil. Steril. – 1994. – Vol. 62, N3. – P. 639–641.
8. Devroey P., Nagy Z., Tournaye H. et al. Outcome of intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa in obstructive and non-obstructive azoospermia // J. Hum. Reprod. – 1996. – Vol. 11, N5. – P. 1015–1018.
9. Gardner D., Lane M., Stevens J. Schoolcraft W. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential // Fertil. Steril. – 2001. – Vol. 76, N6. – P. 1175–1180.
10. Hovatta O., Moilanen J., von Smitten K. et al. Testicular needle biopsy, epididymal aspiration and intracytoplasmic sperm injection in obstructive azoospermia // J. Hum. Reprod. – 1995. – Vol. 10, N10. – P. 2595–2599.
11. Jacques I., Phillips S., Hemmingset R. et al. Ongoing pregnancy after ICSI of frozen-thawed PESA-retrieved spermatozoa and IVF in a controlled natural cycle // Reprod. BioMed. Online. – 2005. – Vol. 10, N5. – P. 650–652.
12. Janzen N. Use of electively cryopreserved microscurgically aspirated epididymal sperm with IVF and intracytoplasmic



7. Devroey P., Liu J., Nagy Z. et al. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection (TESE and ICSI) // *Fertil. Steril.* – 1994. – Vol. 62, №3. – P. 639–641.
8. Devroey P., Nagy Z., Tournaye H. et al. Outcome of intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa in obstructive and non-obstructive azoospermia // *J. Hum. Reprod.* – 1996. – Vol. 11, №5. – P. 1015–1018.
9. Gardner D., Lane. M., Stevens J. Schoolcraft W. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential // *Fertil. Steril.* – 2001. – Vol. 76, №6. – P. 1175–1180.
10. Hovatta O., Moilanen J., von Smitten K. et al. Testicular needle biopsy, open biopsy, epididymal aspiration and intracytoplasmic sperm injection in obstructive azoospermia // *J. Hum. Reprod.* – 1995. – Vol. 10, №10. – P. 2595–2599.
11. Jacques I., Phillips S., Hemmingsset R. et al. Ongoing pregnancy after ICSI of frozen-thawed PESA-retrieved spermatozoa and IVF in a controlled natural cycle // *Reprod. BioMed. Online.* – 2005. – Vol. 10, №5. – P. 650–652.
12. Janzen N. Use of electively cryopreserved microsurgically aspirated epididymal sperm with IVF and intracytoplasmic sperm injection for obstructive azoospermia // *Fertil. Steril.* – 2000. – Vol. 74, №4. – P. 696–701.
13. Jin L., Jiang L.Y., Zhu G.J. et al. Comparison between the results of ICSI with fresh and with frozen-thawed sperm obtained by PESA to treat azoospermia // *Zhonghua Nan Ke Xue.* – 2006. – Vol. 12, №5. – P. 443–449.
14. Kalsi J., Thum MY., Muneer A. Analysis of the outcome of intracytoplasmic sperm injection using fresh or frozen sperm // *Br. J. Urol.* – 2011. – Vol. 107, №7. – P. 1124–1128.
15. Munne S., Alikani M., Tomkin G. et al. Embryo quality and chromosome abnormalities after ICSI. Abstract from the IXth World Congress on IVF and Alternate Assisted Reproduction // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 1995. – Vol. 76, №12. – P. 76.
16. Ou L., Guo YH., Sun YP. et al. Outcomes of ICSI with micro-amount frozen-thawed sperm obtained by PESA or TESA in the treatment of azoospermia // *Zhonghua Nan Ke Xue.* – 2010. – Vol. 16, №4. – P. 328–332.
17. Patrizio P. Cryopreservation of epididymal sperm // *Mol. Cell Endocrinol.* – 2000. – Vol. 169, №1–2. – P. 11–14.
18. Schoysman R., Vanderzwalmen P., Nus M. Pregnancy after fertilization with human testicular spermatozoa // *Lancet.* – 1993. – Vol. 13, №342. – C.1237.
19. Silber S., Nagy Z., Liu J. et al. The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: the genetic implications for male infertility // *J. Hum. Reprod.* – 1995. – Vol. 10, №8. – P. 2031–2043.
20. Silber S., Van Steirteghem A.C., Liu J. et al. High fertilization and pregnancy rates after sperm obtained from testicle biopsy // *J. Hum. Reprod.* – 1995. – Vol. 10, №1. – P. 148–152.
21. Tournaye H., Merdad T., Silber S. et al. No differences in outcome after intracytoplasmic sperm injection with fresh or with frozen-thawed epididymal spermatozoa // *J. Hum. Reprod.* – 1999. – Vol. 14, №1. – P. 90–95.
22. Westlander G., Hamberger L., Hanson Ch. et al. Diagnostic epididymal and testicular sperm recovery and genetic aspects in azoospermic men // *J. Hum. Reprod.* – 1999. – Vol. 14, №1. – P. 118–122.
23. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. – Cambridge, UK, 1999. – 102 p.

