



Новый эффективный способ выделения единичных сперматозоидов из хирургически полученного материала при азооспермии

Е.Е. Захарова, И.В. Капралова, И.С. Кривохорченко, О.О. Жарская, Т.В. Картавенко

Медицинская клиника репродукции «Мама»;
Россия, 127015, г. Москва, ул. Расковой, дом 34, корп. 2

Контакты: Елена Евгеньевна Захарова, eezakharova@gmail.com

Введение. Новый способ обработки хирургически полученного материала из яичка/придатка основан на дифференциальном центрифугировании, которое ранее никогда не применяли для работы со сперматозоидами. Клетки биоптата/аспирата разделяют в соответствии со скоростью седиментации, таким образом сперматозоиды остаются в супернатанте, а осадок с эритроцитами, прочими клетками и дебрисом удаляется. Фракция единичных сперматозоидов из супернатанта может быть получена даже в самых тяжелых случаях.

Материалы и методы. Всего методом дифференциального центрифугирования обработано 436 биологических образцов из яичка/придатка, полученных хирургическим путем у 398 пациентов с азооспермией. Для оценки эффективности нового подхода каждый биологический образец был отнесен к определенной категории качества исходя из содержания сперматозоидов при интраоперационном исследовании. Выделенные сперматозоиды использовали для оплодотворения ооцитов и/или криоконсервировали. Выполнен ретроспективный анализ данных.

Результаты. При микроскопическом исследовании хирургически полученного биологического материала у 237 пациентов (59,5%) был обнаружен по крайней мере один сперматозоид во всем объеме пробы. Эффективность дальнейшей обработки методом дифференциального центрифугирования независимо от качества образца составила 99,6% (сперматозоиды для оплодотворения были получены в 236 случаях, а в 214 из них дополнительно была выполнена криоконсервация – 90,7%). У 199 пациентов при интраоперационном исследовании хирургически полученного биологического материала сперматозоиды не обнаружены. После обработки методом дифференциального центрифугирования единичные сперматозоиды выделены и использованы для оплодотворения ооцитов в 40 случаях (20%).

Заключение. Новый способ позволяет выделить мужские половые клетки из хирургически полученного материала и использовать их для оплодотворения и/или криоконсервировать даже в самых тяжелых случаях, когда стандартный метод, основанный на простой отмывке с последующим отбором сперматозоидов из осадка, малоэффективен.

Ключевые слова: азооспермия, биопсия из яичка/придатка, аспирация из придатка, хирургическое получение сперматозоидов, дифференциальное центрифугирование, единичные сперматозоиды.



A new effective method for isolating single spermatozoa from surgically obtained material in azoospermia

E.E. Zakharova, I.V. Kapralova, I.S. Krivokharchenko, O.O. Zharskaya, T.V. Kartavenko

Center for Reproductive Medicine "Mama", Moscow, Russia

Contacts: Elena Zakharova, eezakharova@gmail.com

Introduction. Conventional methods of processing testicular and epididymal specimens are based on simple washing, so that spermatozoa are contaminated with other cells and difficult to recover from the sediment. The newly method is based on differential centrifugation, which has never been used for male germ cells before. Cell particles are separated according to their sedimentation rate so that spermatozoa remain in the supernatant, whereas the sediment with extra cells and debris is removed. A pure fraction of spermatozoa from supernatant is retrieved even in severe cases.

Methods. A total of 436 specimens surgically obtained from epididymis/testis in 398 patients were treated using method of differential centrifugation. To evaluate the effectiveness of the new approach, each biological sample was assigned to a specific quality category based on sperm content during intraoperative examination. The recovered spermatozoa were used to fertilize the fresh spouse's oocytes and/or cryopreserved. A retrospective data analysis was performed.

Results. The microscopic examination surgically obtained specimens revealed at least one spermatozoon in all fields of view in 237 patients (59,5%). The further processing by differential centrifugation was 99,6% efficient (spermatozoa for fertilization were recovered in 236 cases, including cryopreservation in 214 cases). In 199 patients no spermatozoa were found during intraoperative examination. After treatment by differential centrifugation, single spermatozoa were isolated and used for oocyte fertilization in 40 cases (20%).

Conclusion. The newly proposed method of processing cell suspensions for spermatozoa recovery allows obtaining male germ cells from biopsy samples and using them for fertilization, especially if they are critically low in number and conventional methods for sperm recovery do no work or inefficient.

Keywords: azoospermia, testicular/epididymis biopsy, epididymal aspiration, surgical sperm retrieval, differential centrifugation, single spermatozoa.

Введение

Применение хирургического подхода для получения сперматозоидов при азооспермии является распространенной практикой на пути преодоления данного вида мужского бесплодия [1]. Аспират или биоптат из придатка/яичка подлежат микроскопическому исследованию и дальнейшей обработке в условиях эмбриологической лаборатории. На лабораторном этапе из хирургически полученных биологических образцов осуществляют выделение сперматозоидов в целях вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [2, 3].

Согласно руководству ВОЗ [4], для обработки аспирата из эпидидимиса с высоким содержанием сперматозоидов может быть применен метод центрифугирования в градиенте плотности, в то время как для обработки аспирата с низким содержанием сперматозоидов и тестикулярных образцов используют метод простой отмывки. Кроме того, для работы с биологическим материалом с низким содержанием сперматозоидов предложены раз-

личные лабораторные подходы и техники, которые также основаны на методе простой отмывки и направлены на дальнейшую идентификацию единичных половых клеток, их отбор, использование при оплодотворении и криоконсервацию [2–8]. В числе возможных альтернативных способов обработки тестикулярных образцов выделяют новые технологии клеточной сортировки [5] и центрифугирование в градиенте плотности [6]. Однако вопрос получения половых клеток из биоптата/аспирата на лабораторном этапе все еще остается актуальным: до сих пор не существует универсального способа, который мог бы в полной мере обеспечить выделение единичных сперматозоидов из хирургически полученного биологического материала [2, 3, 5, 7–12].

Проблема хирургического получения сперматозоидов обусловлена значительной контаминацией биологических образцов эритроцитами и соматическими клетками [2–4, 7, 8, 13]. В результате обработки суспензии из придатка или яичка все ее компоненты оказываются сконцентрированными в едином осадке (рис. 1А), что приводит к потере мужских половых

клеток, а также осложняет или делает невозможным их поиск и дальнейшее извлечение [2–4, 8]. Согласно опубликованным данным, способы обработки биоптата или аспирата, основанные на методе простой отмывки, имеют ограничения, а ключевую роль в получении сперматозоидов отводят субъективному подходу эмбриолога к работе с каждым тестикулярным или эпидидимальным образцом [2, 8, 14]. В связи с этим поиск новых универсальных и эффективных способов обработки биологических образцов из яичка или придатка остается актуальной задачей [3, 7].

Если говорить об эффективности хирургического способа получения сперматозоидов при азооспермии, то, по опубликованным данным, этот показатель находится в широких пределах — от 18 до 70%, что обусловлено клиническим различием групп пациентов, разнообразием применяемых хирургических и эмбриологических техник, степенью раскрытия информации и особенностью интерпретации результатов [12]. Большинство исследований в данной области направлено на поиск корреляции между причиной азооспермии и результатом операции с учетом применяемой терапии или способа хирургического вмешательства [15]. Таким образом, существующие показатели эффективности хирургического получения

сперматозоидов не могут быть референтными для оценки лабораторных методов обработки соответствующего биологического материала. Несмотря на очевидную зависимость вероятности получения сперматозоидов от их количественного содержания в биологическом образце, до сих пор не представлены критерии лабораторной оценки качества биоптата или аспирата, основанные на характеристике полученного биологического материала; не обозначены пороговые значения содержания сперматозоидов, при которых тот или иной метод обработки может быть достаточно эффективным.

В предложенной статье представлен новый способ обработки хирургически полученного биологического материала из придатка или яичка [16], который основан на методе дифференциального центрифугирования и ранее никогда не был применен в работе с мужскими половыми клетками. Параметры центробежной силы и времени подобраны экспериментальным путем и являются специфическими для данной биологической системы. Новизной и преимущественной особенностью предложенного подхода является то, что после обработки биоптата или аспирата сперматозоиды извлекают не из осадка, представленного массой эритроцитов и соматических клеток, а из надосадочной жидкости — очищенной фракции наименьших по размеру и весу частиц, что значительно облегчает их дальнейший поиск и выделение в целях ВРТ [17, 18] (рис. 1Б).

Для объективной оценки результативности нового метода нами была предложена характеристика качества обрабатываемого биологического материала, основанная на количественном содержании сперматозоидов. В ретроспективном неконтролируемом исследовании впервые получены данные об эффективности хирургического получения сперматозоидов в контексте качества биологического материала и применяемой к его обработке лабораторной технологии.

Показана эффективность нового метода при выделении сперматозоидов для оплодотворения и криоконсервации из эпидидимальных и тестикулярных образцов разного качества; проанализированы крайне тяжелые клинические случаи с успешным получением сперматозоидов из биологического материала, в котором при первичной микроскопической оценке мужские половые клетки обнаружены не были. Метод проиллюстрирован клиническими примерами.

Материалы и методы

Детальное описание нового способа обработки хирургически полученного биологического материала из яичка/придатка методом дифференциального центрифугирования опубликовано ранее [16].

Параллельная обработка биоптата из яичка методами дифференциального центрифугирования и простой отмывки (клинический пример). Полученные в ходе

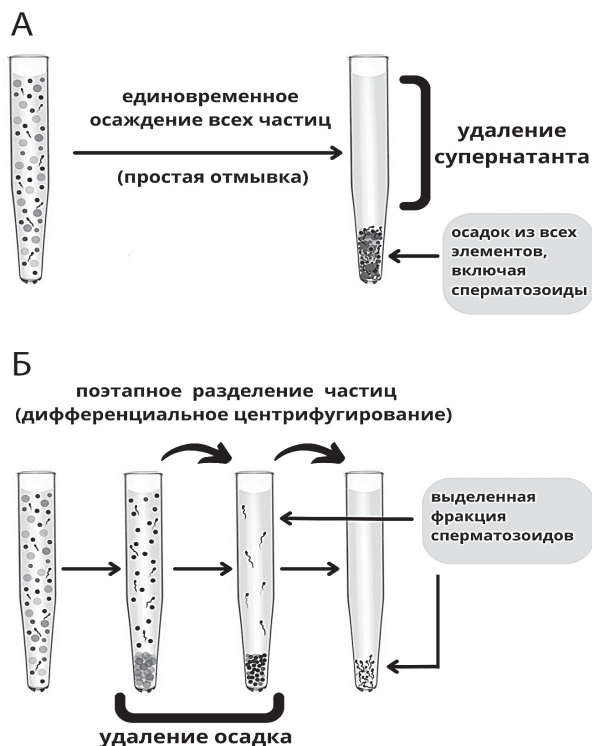


Рисунок 1. Методы обработки хирургически полученного материала из яичка/придатка: А — простая отмывка; Б — дифференциальное центрифугирование

Figure 1. Methods of processing testicular and epididymal specimens: A — simple washing; B — differential centrifugation

биопсии с микродиссекцией из яичка биологические образцы тестикулярной ткани были разделены на две равные части и обработаны общепринятым способом простой отмывки [12] (рис. 1А) и новым методом дифференциального центрифугирования (рис. 1Б) соответственно. Проведена сравнительная оценка эффективности указанных способов, примененных к одному биологическому материалу.

Оплодотворение ооцитов и криоконсервация выделенных сперматозоидов. Выделенные из супернатанта сперматозоиды использовали для оплодотворения ооцитов в синхронном цикле ЭКО и/или криоконсервировали для отсроченного использования в целях ВРТ. Для идентификации живых сперматозоидов и отбора единичных половых клеток для внутрицитоплазматической инъекции в ооцит применяли общепринятые подходы [18]. Криоконсервацию мужских половых клеток проводили согласно протоколам производителей коммерческих сред для замораживания гамет человека, в качестве крионосителей использовали криосоломины объемом 0,25 мл. или криотопы [19].

Группы исследования. Всего в период с 2012 по 2023 г. методом дифференциального центрифугирования было обработано 357 образцов (биоптатов) тестикулярной ткани, 17 биоптатов из эпидидимиса и 62 образца аспирата из эпидидимиса, полученных хирургическим путем у 398 пациентов с азооспермией. Выполнен ретроспективный анализ данных.

Каждый образец хирургически полученного биологического материала (аспират или суспензия из биоптата после первичной обработки) на основании результата первичной микроскопической оценки (x200) был отнесен к определенной категории качества (А–Е): А – один и более сперматозоидов на пять полей зрения; Б – один сперматозоид на 6–10 полей зрения; В – один сперматозоид на 10–20 полей зрения; Г – один сперматозоид на 20–40 полей зрения; Д – единичные сперматозоиды на все поля зрения всего объема полученного биологического материала; Е – сперматозоиды не обнаружены.

Для каждого типа биологического материала и в каждой его категории была проведена оценка возможности выделения сперматозоидов в достаточном количестве для выполнения внутрицитоплазматической инъекции в ооцит в синхронном цикле ЭКО или для криоконсервации. Эффективным считали выделение в тех случаях, когда сперматозоиды были получены и использованы, по крайней мере, для оплодотворения ооцитов. Для случаев с выполненной криоконсервацией выделенных сперматозоидов учитывали количество крионосителей с содержанием сперматозоидов, достаточным для выполнения эквивалентного количества циклов ЭКО (один крионоситель – одна программа ЭКО).

Для самых сложных клинических случаев (категория качества биологического материала «Е» – сперматозоиды не обнаружены), в которых в результате дифференциальной обработки были успешно выде-

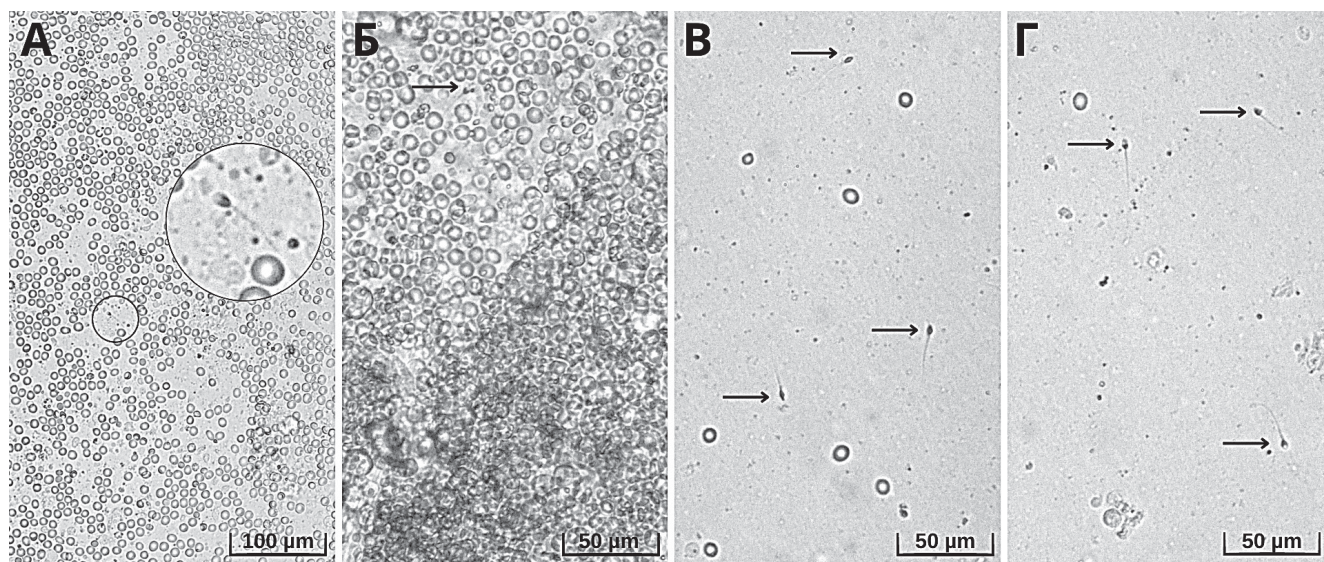


Рисунок 2. Материал биопсии из яичка при НОА, обработанный разными способами (сперматозоиды отмечены стрелками): А – суспензия из яичка (x200); Б – осадок после простой отмывки (x400); В – выделенная фракция сперматозоидов, полученная в результате дифференциального центрифугирования суспензии (x400); Г – выделенная фракция сперматозоидов, полученная в результате дифференциального центрифугирования осадка после простой отмывки

Figure 2. Testicular biopsy material from patient with NOA treated in different ways (spermatozoa indicated by arrows): А – testicular biopsies suspension (x200); В – cell sediment after simple washing (x400); С – pure fraction of spermatozoa, retrieved after differential centrifugation of suspension; D – pure fraction of spermatozoa, retrieved after differential centrifugation of sediment after simple washing



лены единичные сперматозоиды, проанализированы клинико-эмбриологические показатели: наличие генетической патологии у пациента, гистологическая оценка сперматогенеза, доля нормальных зигот от общего числа ооцитов, доля бластоцист от общего числа полученных эмбрионов, доля рекомендованных к переносу эмбрионов по результату преимплантационного генетического тестирования (ПГТ), частота наступления беременности (ЧНБ) на программу ВРТ (синхронный цикл ЭКО, перенос размороженных эмбрионов) и кумулятивная ЧНБ на пациента.

Результаты

Параллельная обработка биоптата из яичка методами дифференциального центрифугирования и простой отмывки (клинический пример). Пациент, 33 г., секреторная форма азооспермии. В ходе биопсии с микродиссекцией из яичка получены образцы тестикулярной ткани, представленные фрагментами семенных канальцев, в общем объеме отмывочной среды 10 мл. При микроскопическом исследовании клеточной суспензии, полученной после первичной механической обработки, обнаружены сперматозоиды в количестве одного на 20 полей зрения (x200) (рис. 2А).

В результате простой отмывки получен осадок, содержащий единичные сперматозоиды в количестве одного на десять полей зрения (x400) (рис. 2Б). Поиск и извлечение сперматозоидов затруднены, криоконсервация биологического материала данного качества не рекомендована [21].

В результате дифференциального центрифугирования фракция сперматозоидов была отделена от других компонентов суспензии. Содержание сперматозоидов, выделенных из супернатанта, составило от двух до пяти в одном поле зрения (x400) (рис. 2В). Полученные сперматозоиды были использованы для оплодотворения ооцитов в синхронном цикле ЭКО, оставшаяся часть биологического материала криоконсервирована в двух криосоломинах по 0,25 мл; количества выделенных сперматозоидов на каждом крионосителе достаточно для проведения процедуры ICSI после размораживания.

В целях сохранения части биологического материала, обработанной методом простой отмывки, полученный осадок был ресуспендирован в объеме отмывочной среды (10 мл) и также обработан методом дифференциального центрифугирования. Содержание сперматозоидов, выделенных из супернатанта, составило от двух до пяти в одном поле зрения (x400) (рис. 2Г). Выделенные сперматозоиды криоконсервированы еще в двух криосоломинах по 0,25 мл.

Применение метода дифференциального центрифугирования для выделения сперматозоидов из эпидидимальных и тестикулярных образцов различного качества (таблица 1).

Независимо от вида или качества полученного биологического материала (аспират или биоптат из яичка/придатка; качество «А» — «Г»), мужские половые клетки для проведения внутрицитоплазматической инъекции в ооцит были успешно выделены во всех случаях. При обработке биоптата из яичка качества «Д» (до одного сперматозоида на все поля зрения) эффективность выделения сперматозоидов составила 96%.

Криоконсервация выделенных сперматозоидов была выполнена во всех случаях обработки аспирата или биоптата из придатка независимо от их начального количественного содержания, а также во всех случаях обработки биоптата из яичка при качестве биологического материала «А» — «В» (до одного сперматозоида на 10–20 полей зрения, x200). При качестве биоптата из яичка «Г» (до одного сперматозоида на 20–40 полей зрения, x200) и «Д» (до одного сперматозоида на все исследованные поля зрения) криоконсервация выделенных сперматозоидов выполнена в 81% и 27% случаев соответственно.

Число крионосителей с выделенными сперматозоидами, полученными от одной хирургической процедуры с последующей обработкой аспирата или биоптата, составило от одного до шестнадцати и было прямо пропорционально исходному качеству полученного биологического материала. Согласно результату микроскопической оценки биологического материала перед криоконсервацией, во всех случаях содержания выделенных сперматозоидов на каждом крионосителе достаточно для проведения программы ЭКО.

Применение метода дифференциального центрифугирования к тестикулярным образцам, в которых при интраоперационном микроскопическом исследовании сперматозоиды не обнаружены. При микроскопическом исследовании всего объема биологического материала, полученного из биоптата из яичка после его первичной механической обработки, в 199 случаях из 357 (55,74%) сперматозоиды обнаружены не были (группа качества биологического материала «Е», таблица 1). Однако в результате последующего применения технологии дифференциального центрифугирования из биологического материала данного качества в 40 случаях из 199 (20,10%) были выделены единичные сперматозоиды для проведения внутрицитоплазматической инъекции в ооцит; в двух случаях из сорока выполнена криоконсервация оставшихся единичных сперматозоидов, в том числе у пациента с синдромом Клайнфельтера.

Клинико-эмбриологические показатели в группе пациентов с успешным получением сперматозоидов при отсутствии сперматозоидов в биоптате из яичка по результату интраоперационного микроскопического исследования.

У всех сорока пациентов данной группы ранее была выявлена необструктивная азооспермия (НОА)



различного генеза, в том числе в шестнадцати случаях НОА являлась генетически обусловленной или отягощенной патологией кариотипа.

Клинико-эмбриологические данные группы с НОА, отягощенной генетическим фактором, представлены в таблице 2. Возраст пациентов составил $31,12 \pm 4,48$ года; гистологическая оценка сперматогенеза по шкале Гольштейна [22] варьировала от 7 до 1 балла (от значительно сниженного сперматогенеза без зрелых сперматид и спермации до герми-

нально-клеточной аплазии у пациентов с синдромом Клайнфельтера); частота нормального оплодотворения ооцитов выделенными сперматозоидами составила 58,2% (64/111); частота формирования blastocyst – 71,9% (46/64); доля эмбрионов, рекомендованных к переносу по результату ПГТ (диагностика выполнена в 13 случаях из 16), – 52,6% (20/38); частота наступления беременности на цикл ВРТ с переносом эмбрионов (синхронный цикл ЭКО, перенос замороженных эмбрионов) – 21,1% (4/19); кумулятивная

Таблица 1. Хирургически полученные образцы биологического материала из придатка/яичка, обработанные методом дифференциального центрифугирования

центrifугирования							
Аспират из эпидидимиса (N=62)							
Качество при интраоперационном исследовании*	A(n=45)	B(n=8)	B(n=7)	Г(n=2)	Д(n=0)	E(n=0)	
Получены сперматозоиды для ICSI и/или криоконсервации (случаи)	45	8	7	2	***		
Количество крионосителей **	10±1,37	8,6±1,4	4,3±1,1	2			
Эффективность выделения для ICSI и/или криоконсервации (доля случаев)	100%						
Биоптат из эпидидимиса (N=17)							
Качество при интраоперационном исследовании*	A (n=2)	B (n=8)	B (n=3)	Г (n=2)	Д (n=2)	E (n=0)	
Получены сперматозоиды для ICSI и/или криоконсервации (случаи)	2	8	2	2	2	****	
Количество крионосителей **	9,0±1,4	7,5±0,9	3,5±0,7	1,5±0,7	1		
Эффективность выделения для ICSI и/или криоконсервации (доля случаев)	100%						
Биоптат из яичка (N= 357)							
Качество при интраоперационном исследовании*	A(n=13)	B(n=34)	B(n=51)	Г(n=37)	Д(n=23)	E(n=199)	
Получены сперматозоиды для ICSI (случаи)	13	34	51	37	22	40	
Получены сперматозоиды для криоконсервации (случаи)	13	34	51	30	6	2	
Количество крионосителей **	8±1,4	7,4±1,1	3,7±0,7	1,4±0,6	1	1	
Эффективность выделения сперматозоидов для ЭКО (доля случаев)				100%	96%	20%	
Эффективность выделения сперматозоидов для криоконсервации (доля случаев)				100%	81%	5%	

* Качество биологического материала при интраоперационном исследовании (x200): **A** - один и более сперматозоидов на пять полей зрения; **B** - один сперматозоид на 6-10 полей зрения; **B** - один сперматозоид на 10-20 полей зрения; **Г** - один сперматозоид на 20-40 полей зрения; **Д** - единичные сперматозоиды на все поля зрения всего объема полученного биологического материала; **Е** - сперматозоиды не обнаружены.

** Минимально возможное количество крионосителей, содержащих сперматозоиды в достаточном для ЭКО количестве (один крионоситель - одна программа ЭКО).

*** При низком содержании сперматозоидов или их отсутствии в аспирате из придатка далее получали и обрабатывали биоптат из придатка и/или яичка.

**** При низком содержании сперматозоидов или их отсутствии в биоптате из придатка далее получали и обрабатывали биоптат из яичка.

Table 1. Surgically obtained epididymal/testicular specimens processed by differential centrifugation

Aspirate from the epididymis (N=62)							
Specimens quality in intraoperative study*	A(n=45)	B(n=8)	C(n=7)	D(n=2)	E(n=0)	F(n=0)	
Successful spermatozoa retrieval for ICSI and/or cryopreservation (number of cases)	45	8	7	2	***		
Number of cryonic carriers**	10±1,37	8,6±1,4	4,3±1,1	2			
Efficacy of spermatozoa extraction for ICSI and/or cryopreservation (cases rate)	100%						
Epididymal biopsies (N=17)							
Specimens quality in intraoperative study*	A (n=2)	B(n=8)	C(n=3)	D(n=2)	E(n=2)	F(n=0)	
Successful spermatozoa retrieval for ICSI and/or cryopreservation (number of cases)	2	8	2	2	2	****	
Number of cryonic carriers**	9,0±1,4	7,5±0,9	3,5±0,7	1,5±0,7	1		
Efficacy of spermatozoa extraction for ICSI and/or cryopreservation (cases rate)	100%						
Testicular biopsies (N= 357)							
Specimens quality in intraoperative study*	A(n=13)	B(n=34)	C(n=51)	D(n=37)	E(n=23)	F(n=199)	
Successful spermatozoa retrieval for ICSI (number of cases)	13	34	51	37	22	40	
Successful spermatozoa retrieval for cryopreservation (number of cases)	13	34	51	30	6	2	
Number of cryonic carriers**	8±1,4	7,4±1,1	3,7±0,7	1,4±0,6	1	1	
Efficacy of spermatozoa extraction for ICSI (cases rate)				100%	96%	20%	
Efficacy of spermatozoa extraction for cryopreservation (cases rate)				100%	81%	5%	

* The quality of biological material during intraoperative examination (x200): **A** - one or more spermatozoa per five fields of view; **B** - one sperm per 6-10 fields of view; **C** - one sperm per 10-20 fields of view; **D** - one sperm per 20-40 fields of view; **E** - single spermatozoa in all fields of view of the entire volume of the obtained biological material; **F** - no one spermatozoa were found.

** The minimal possible number of cryonic carriers containing spermatozoa in sufficient quantity for ICSI (one cryonic carrier - one IVF program).

*** In case of low or no spermatozoa in the epididymis aspirate, a biopsy specimen from the epididymis and/or testis was further obtained and processed.

**** In case of low or no spermatozoa in the biopsy specimen from the epididymis, a biopsy specimen from the testis was further obtained and processed.



частота наступления беременности — 25,0% (4/16). На данный момент рождено трое здоровых детей, в том числе первый в мире ребенок от отца с НОА и одновременно носителем реципрокной транслокации [23]; одна беременность замерла на раннем сроке.

В группе с НОА, неотягощенной генетическим фактором (24 случая), возраст пациентов составил 34,78 ± 6,4 года; гистологическая оценка сперматогенеза по шкале Гольштейна — 8–6 баллов, что соответствует значительному и резкому снижению сперматогенеза (от единичных зрелых сперматид без спермидии до единичных незрелых сперматид); частота нормального оплодотворения — 58,6% (92/157); частота формирования blastocyst — 61,9% (57/92); доля эмбрионов, рекомендованных к переносу по результату ПГТ (диагностика выполнена у 11 пациентов), — 71,4% (25/35); частота наступления беременности на цикл ВРТ с переносом эмбрионов (синхронный цикл ЭКО, перенос размороженных эмбрионов) — 37,5% (12/32); кумулятивная частота наступления беременности — 50% (12/24). На данный момент рождено десять здоровых детей, две беременности прервались на ранних сроках.

Обсуждение

В качестве демонстрации нового подхода предложен клинический пример с параллельной обработкой одного образца тестикулярной ткани традиционным способом простой отмывки и методом дифференциального центрифугирования соответственно. Показано, что при содержании сперматозоидов в суспензии из яичка в количестве одного на 20 полей зрения (x200) метод простой отмывки если и обеспечивает визуализацию единичных половых клеток в осадке, то не гарантирует их получения для проведения оплодотворения или криоконсервации. Одновременно с этим метод дифференциального центрифугирования обеспечивает получение сперматозоидов как для выполнения оплодотворения, так и для криоконсервации. Применение нового подхода к уже обработанному стандартным способом, но малоперспективному для целей ВРТ биологическому материалу также позволяет выделить сперматозоиды в достаточном количестве для оплодотворения и криоконсервации, что в явном виде демонстрирует преимущество метода дифференциального центрифугирования перед методом простой отмывки.

Метод дифференциального центрифугирования, впервые предложенный для разделения компонентов суспензии из тестикулярных/эпидидимальных образцов, принципиально отличается от всех известных ранее способов и решает основную проблему контаминации аспирата или биоптата эритроцитами и соматическими клетками. Результатом дифференциального центрифугирования является получение относительно чистой фракции частиц наименьшего

размера и веса, к которым относятся и сперматозоиды, что решает основную проблему их идентификации и выделения, а также минимизирует риск потери. Результаты представленного ретроспективного исследования показывают, что новый способ обеспечивает выделение мужских половых клеток из хирургически полученного биологического материала практически во всех случаях, если при интраоперационном исследовании визуализирован хотя бы один сперматозоид.

Общепринятой лабораторной обработке подлежит биологический материал из придатка/яичка, в котором сперматозоиды легко идентифицируются, в противном случае оперативное вмешательство считают неэффективным [3]. К настоящему времени в литературе описан единственный клинический случай, когда у пациента с НОА при отрицательном интраоперационном исследовании сперматозоиды удалось выделить в ходе последующей стандартной обработки методом простой отмывки [24]. Таким образом, безусловным показателем эффективности нового предложенного подхода является возможность получения сперматозоидов у пациентов с отрицательным результатом интраоперационного исследования.

Нами впервые показано, в каждом пятом случае, когда при интраоперационном микроскопическом исследовании биоптата из яичка сперматозоиды не обнаружены, возможно получение единичных сперматозоидов путем дифференциального центрифугирования. Особого внимания заслуживают случаи с НОА, отягощенной генетическим фактором, когда прогноз на получение сперматозоидов изначально может быть неблагоприятным. Благодаря применению метода дифференциального центрифугирования показано, что у пациентов с НОА при генетически обусловленном и гистологически подтвержденном нарушении развития мужских половых клеток (вплоть до герминально-клеточной аплазии) не исключен заверченный сперматогенез и возможно получение сперматозоидов даже при отрицательном интраоперационном исследовании. Выделенные единичные сперматозоиды могут быть использованы для оплодотворения ооцитов с положительным исходом программы ВРТ — достижением беременности и родов. Таким образом, даже в крайне тяжелых случаях с НОА, когда содержание сперматозоидов критически мало и находится за порогом возможности их визуализации при первичной микроскопической оценке, новый метод обеспечивает не только их выделение, но и результативное использование.

Клинико-эмбриологические показатели программы ВРТ у пациентов с отрицательным результатом интраоперационного исследования (частота нормального оплодотворения, частота формирования blastocyst,



Таблица 2. Клинико-эмбриологические данные группы пациентов с НОА, отягощенной генетическим фактором. При отрицательном результате нонтраоперационного исследования сперматозоиды получены в ходе дифференциального центрифугирования.

№	воз- раст	Генетический фактор	Патологоанатомическое исследование биопсийного (операционного) материала	Hol	2pn/ MII	BI/ 2pn	ПГТ	ПЭ	Беременность/роды
1	33	47,XXY,9ph+; AZFc: sY1291	Герминально-клеточная аплазия	1	2/2	2/2	2/2	2	нет
2	35	46,XY,t(2;13)(p13;q22); AZFc: sY254, sY255;	Блокада созревания первичных сперматоцитов	3-4	2/4	2/2	0/2	—	—
3	27	46,XY,t(14;20)(p11.2;q13.1)	Нарушение дифференцировки сперматид	6-7	3/8	2/3	1/2	1	ДА/здоровый мальчик [23]
4	25	47,XXY	Герминально-клеточная аплазия, гиперплазия клеток Лейдига	1	3/8	3/3	2/3	2	нет
5	22	47,XXY	Герминально-клеточная аплазия	2	7/7	7/7	4/7	1	ДА/ЗБ (7 недель)
6	31	47,XXY	Герминально-клеточная аплазия	1	10/11	4/10	2/4	2	нет
7	28	AZFc: sY254, sY255	Нарушение дифференцировки сперматид	6	3/5	3/3	—	2	ДА/здоровый мальчик
8	35	AZFc: sY254, sY255	Блокада созревания первичных сперматоцитов	4	4/6	4/4	—	1	нет
9	32	AZFc: sY157; sY254; sY255	Нарушение дифференцировки сперматид	6	11/14	4/11	1/4	1	нет
10	35	AZFc: sY242; sY254; sY1206;	Нарушение дифференцировки сперматид	6-7	2/8	2/2	1/2	1	нет
11	34	AZFc: sY242, sY254, sY1291, sY255, sY1206	Блокада созревания первичных сперматоцитов	5	2/3	2/2	2/2	1	нет
12	25	AZFc: sY242, sY254, sY1291, sY255, sY1206	Блокада созревания первичных сперматоцитов	5	1/6	1/1	1/1	1	нет
13	33	AZFc: sY254; sY255	Нарушение дифференцировки сперматид	6	2/6	1/2	—	1	нет
14	36	AZFc: sY 157; sY254; sY255	Блокада созревания первичных сперматоцитов	5	5/7	4/5	2/4	2	нет
15	29	AZFc: sY254;sY255;sY1291; sY1206; sY242	Блокада созревания сперматогониев	2-3	2/8	1/2	0/1	—	—
16	38	AZFc: sY254, sY255, sY1291, sY1206, sY242	Блокада созревания первичных сперматоцитов	5	5/8	4/5	2/4	1	ДА/здоровая девочка

НОА - необструктивная азооспермия; **AZFc** - микроделеции AZF локуса Y-хромосомы, субрегион "с"; **Hol** - оценка сперматогенеза по шкале Гольштейна [22], баллы ; **2pn/MII** - нормальное плодотворение, выраженное в отношении числа зигот с двумя пронуклеусами (2pn) к числу зрелых ооцитов (MII) после внутритритоцитарной инъекции сперматозоида в ооцит; **BI/2pn** - формирование бластоцист, выраженное в отношении числа эмбрионов, достигших стадии бластоцисты на 5-6 сутки развития (BI) к числу зигот с двумя пронуклеусами (2pn); **ПГТ** - результат преимплантационного генетического тестирования, выраженный в отношении числа эмбрионов без генетической патологии к общему числу исследуемых эмбрионов после биопсии; **ПЭ** - число переносов эмбрионов ("свежий" цикл, перенос размороженных эмбрионов); **ЗБ** - замершая беременность.

Table 2. Clinical and embryological data of patients with NOA aggravated with genetic factor, in whom no spermatozoa were found during intraoperative examination, but were successfully isolated as a result of differential centrifugation

№	age	Genetic factor	Pathological anatomical examination of biopsy (surgical) material	Hol	2pn/ MII	BI/ 2pn	PGT	ET	Pregnancy/delivery
1	33	47,XXY,9ph+; AZFc: sY1291	Germ cell aplasia	1	2/2	2/2	2/2	2	no
2	35	46,XY,t(2;13)(p13;q22); AZFc: sY254, sY255;	Maturation arrest at the primary spermatocyte stage	3-4	2/4	2/2	0/2	—	—
3	27	46,XY,t(14;20)(p11.2;q13.1)	Impaired of spermatids differentiation	6-7	3/8	2/3	1/2	1	YES/healthy boy [23]
4	25	47,XXY	Germ cell aplasia, Leydig cell hyperplasia	1	3/8	3/3	2/3	2	no
5	22	47,XXY	Germ cell aplasia	2	7/7	7/7	4/7	1	YES/LP (7 weeks)
6	31	47,XXY	Germ cell aplasia	1	10/11	4/10	2/4	2	no
7	28	AZFc: sY254, sY255	Impaired of spermatids differentiation	6	3/5	3/3	—	2	YES/healthy boy
8	35	AZFc: sY254, sY255	Maturation arrest at the primary spermatocyte stage	4	4/6	4/4	—	1	no
9	32	AZFc: sY157; sY254; sY255	Impaired of spermatids differentiation	6	11/14	4/11	1/4	1	no
10	35	AZFc: sY242; sY254; sY1206;	Impaired of spermatids differentiation	6-7	2/8	2/2	1/2	1	no
11	34	AZFc: sY242, sY254, sY1291, sY255, sY1206	Maturation arrest at the primary spermatocyte stage	5	2/3	2/2	2/2	1	no
12	25	AZFc: sY242, sY254, sY1291, sY255, sY1206	Maturation arrest at the primary spermatocyte stage	5	1/6	1/1	1/1	1	no
13	33	AZFc: sY254; sY255	Impaired of spermatids differentiation	6	2/6	1/2	—	1	no
14	36	AZFc: sY 157; sY254; sY255	Maturation arrest at the primary spermatocyte stage	5	5/7	4/5	2/4	2	no
15	29	AZFc: sY254;sY255;sY1291; sY1206; sY242	Maturation arrest at the spermatogonia stage with the onset of atrophy	2-3	2/8	1/2	0/1	—	—
16	38	AZFc: sY254, sY255, sY1291, sY1206, sY242	Maturation arrest at the primary spermatocyte stage	5	5/8	4/5	2/4	1	YES/healthy girl

НОА - non-obstructive azoospermia; **AZFc** - Y chromosome microdeletions in the AZF locus, subregion "c"; **Hol** - spermatogenesis evaluation according to the Holstein scale [22]; **2pn/MII** - normal fertilization, expressed as a ratio of zygotes with two pronuclei (2pn) number to the mature oocytes (MII) number; **BI/2pn** - blastocysts formation, expressed as a ratio of embryos number reached the blastocyst stage on days 5-6 (BI) to the zygotes with two pronuclei (2pn) number; **PGT** - the result of preimplantation genetic testing, expressed as the number of embryos without genetic pathology to the total number of embryos studied after biopsy; **ET** - number of embryo transfers ("fresh" cycle, thawed embryo transfer); **LP** - lost pregnancy.



доля эуплоидных эмбрионов, кумулятивная частота наступления беременности) могут быть сопоставимы с данными, полученными для других групп пациентов, что должно стать предметом дальнейших исследований. Таким образом, использование метода дифференциального центрифугирования открывает новые перспективы и возможности для изучения природы мужского бесплодия и развития способов его преодоления.

Вопрос криоконсервации и сохранения хирургически полученных сперматозоидов также остается актуальным. В настоящее время наиболее распространенными подходами являются замораживание аспирата, биоптата, суспензии из биоптата после ферментативной или механической обработки либо криоконсервация осадка после простой отмывки той же суспензии или аспирата [25]. При работе с размороженным хирургически полученным биологическим материалом сохраняется проблема контаминации образца эритроцитами и соматическими клетками, остается сложность идентификации и выделения единичных сперматозоидов, особенно в случаях с их низким содержанием [25]. Таким образом, возможность выделения половых клеток в ряде случаев может быть определена только после размораживания [3].

Согласно опубликованным данным, криоконсервация хирургически полученного биологического материала из придатка/яичка может быть рекомендована, если при первичной микроскопической оценке обнаружен по крайней мере один подвижный сперматозоид на пять полей зрения [21]. Данная характеристика соответствует качеству «А» предложенной в данной работе классификации. В то же время использование метода дифференциального центрифугирования позволяет выполнить криоконсервацию сперматозоидов, выделенных из био-

логических образцов качества «А» — «Д» (до единичных сперматозоидов на весь объем), что также говорит о высокой эффективности предложенного подхода. Криоконсервация выделенной фракции со сперматозоидами, уже очищенной от основной массы эритроцитов и соматических клеток, может значительно облегчить выделение единичных половых клеток после размораживания образца. Для криоконсервации выделенных единичных сперматозоидов могут быть использованы как стандартные крионосители (соломины, криовials, криотопы), так и усовершенствованные приспособления [6, 26].

Важными аспектами являются стоимость процедуры и время, необходимое для ее выполнения. При реализации метода не требуется использование дополнительного объема отмывочной среды (в сравнении с простой отмывкой), среды с градиентом плотности, каких-либо специальных приспособлений и расходных материалов, повышающих стоимость процедуры, за исключением увеличенного количества пробирок для центрифугирования (до 15), стоимость которых незначительна. Время, затраченное эмбриологом на осуществление процедуры, в среднем занимает до 1,5 часов, в отличие от других подходов, когда процесс выделения сперматозоидов может занимать до 14 часов [5]. Временное преимущество не только сокращает трудозатраты эмбриолога, но и достоверно увеличивает вероятность успешного исхода программы ЭКО [27].

Заключение

Новый способ выделения сперматозоидов из хирургически полученного материала при азооспермии, основанный на дифференциальном центрифугировании, отличается высокой эффективностью получения сперматозоидов, а также в полной мере обеспечивает их использование в программе ВРТ и криоконсервацию.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. In-Vitro Fertilization. 4th Edition. Elder K., Dale B. Cambridge University Press. 2020. ISBN: 9781108441810
2. Popal W., Nagy Z.P. Laboratory processing and intracytoplasmic sperm injection using epididymal and testicular spermatozoa: what can be done to improve outcomes? Clinics (Sao Paulo). 2013;68; 1:125-30. DOI: 10.6061/clinics/2013(sup01)14
3. Verheyen G., Popovic-Todorovic B., Tournaye H. Processing and selection of surgically-retrieved sperm for ICSI: a review. Basic Clin Androl. 2017;21; 27:6. DOI:10.1186/s12610-017-0050-2
4. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, sixth edition. World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. DOI:10.1093/hropen/hoaa020
5. Mangum C.L., Patel D.P., Jafek A.R., Samuel R., Jenkins T.G., Aston K.I., Gale B.K., Hotaling J.M. Towards a better testicular sperm extraction: novel sperm sorting technologies for non-motile sperm extracted by microdissection TESE. Transl Androl Urol. 2020;9: S206-S214. DOI: 10.21037/tau.2019.08.36
6. Berkovitz A., Miller N., Silberman M., Belenky M., Itsykson P. A novel solution for freezing small numbers of spermatozoa using a sperm vitrification device. Hum Reprod. 2018;1;33(11):1975-1983. DOI: 10.1093/humrep/dey304. PMID: 30285105
7. Aydos K., Aydos O.S. Sperm selection procedures for optimizing the outcome of ICSI in patients with NOA. J Clin Med. 2021;18;10(12):2687. DOI: 10.3390/jcm10122687
8. Esteves SC, Varghese AC. Laboratory handling of epididymal and testicular spermatozoa: What can be done to improve sperm injections outcome. J Hum Reprod Sci. 2012;5(3):233-43. DOI: 10.4103/0974-1208.106333
9. Nagy Z.P., Verheyen G., Tournaye H., Devroey P., Van Steirteghem A.C. An improved treatment procedure for testicular biopsy specimens offers more efficient sperm recovery: case series. Fertil Steril. 1997;68(2):376-9. DOI: 10.1016/s0015-0282(97)81534-8
10. Corona G., Minhas S., Giwercman A., Bettocchi C., Dinkelman-Smit M., Dohle G., Fusco F., Kadioglou A., Kliesch S., Kopa Z., Krausz C., Pelliccione F., Pizzocaro A., Rassweiler J., Verze P., Vignozzi L., Weidner W., Maggi M., Sofikitis N. Sperm recovery and ICSI outcomes in men with non-obstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod Update. 2019;5;25(6):733-757. DOI: 10.1093/humupd/dmz028
11. Aydos K., Demirel L.C., Baltaci V., Unlü C. Enzymatic digestion plus mechanical searching improves testicular sperm retrieval in non-obstructive azoospermia cases. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.



- 2005;1;120(1):80-6. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2004.10.009. PMID: 15866091
12. Achermann A.P.P., Pereira T.A., Esteves S.C. Microdissection testicular sperm extraction (micro-TESE) in men with infertility due to nonobstructive azoospermia: summary of current literature. *Int Urol Nephrol.* 2021;53(11):2193-2210. DOI: 10.1007/s11255-021-02979-4
13. Ramasamy R., Reifsnnyder J.E., Bryson C., Zaninovic N., Liotta D., Cook C.A., Hariprashad J., Weiss D., Neri Q., Palermo G.D., Schlegel P.N. Role of tissue digestion and extensive sperm search after microdissection testicular sperm extraction. *Fertil Steril.* 2011;96(2):299-302. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.05.033
14. Verheyen G., De Croo I., Tournaye H., Pletincx I., Devroey P., van Steirteghem A.C. Comparison of four mechanical methods to retrieve spermatozoa from testicular tissue. *Hum Reprod.* 1995;10(11):2956-9. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a135828
15. Arshad M.A., Majzoub A., Esteves S.C. Predictors of surgical sperm retrieval in non-obstructive azoospermia: summary of current literature. *Int Urol Nephrol.* 2020;52(11):2015-2038. DOI: 10.1007/s11255-020-02529-4.
16. Патент РФ на изобретение № 2762489/21.12.21. Бюл. № 36. Захарова Е.Е. Способ выделения сперматозоидов из материала аспирации и/или биопсии из придатка и/или яичка для использования в программах экстракорпорального оплодотворения и/или криоконсервации. Patent RF for an invention № 2762489/21.12.21. Bull. № 36. Zakharova E.E. Method for isolating spermatozoa from aspiration and/or biopsy material from an appendage and/or testicle for use in in vitro fertilization and/or cryopreservation programs. (in Russ.)
17. Zakharova E. New effective method of spermatozoa recovery from surgically-retrieved testicular and epididymal specimens by differential centrifugation. *MedRxiv.* 2022;11.03.22281832. DOI: 10.1101/2022.11.03.22281832
18. Zakharova E. Separating spermatozoa from debris, non-germ and red blood cells during differential centrifugation as a new effective approach of sperm recovery from surgically-retrieved specimens. *Human Reproduction.* 2022;37;1; 105:128. DOI: 10.1093/humrep/deac105.128
19. Simopoulou M., Gkoles L., Bakas P., Giannelou P., Kalampokas T., Pantos K., Koutsilieris M. Improving ICSI: A review from the spermatozoon perspective. *Syst Biol Reprod Med.* 2016;62(6):359-371. DOI: 10.1080/19396368.2016.1229365
20. Huang C., Gan R.X., Hu J.L., Liu F., Hong Y., Zhu W.B., Li Z. Clinical benefit for cryopreservation of single human spermatozoa for ICSI: A systematic review and meta-analysis. *Andrology.* 2022;10(1):82-91. DOI: 10.1111/andr.13091
21. Письмо МЗ РФ №15-4/И/2-1908 от 5 марта 2019 г. «Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация». Pis'mo MZ RF №15-4/И/2-1908 от 5 марта 2019 г. "Vspomogatel'nye reproduktivnye tekhnologii i iskusstvennaya inseminaciya" (In Russ.).
22. Holstein A.F., Schulze W., Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003; 1:107. DOI: 10.1186/1477-7827-1-107
23. Захарова Е.Е., Сухачева Т.С., Мельник Я.И., Дорошук Н.А., Капралова И.В., Биканов Р.А., Фердман Д.К., Залетова В.В. Рождение ребенка у пациента с необструктивной азооспермией и носительством реципрокной транслокации (описание случая). Проблемы репродукции. 2023;29(2):110-115. Zakharova EE, Sukhacheva TS, Melnik YaI, Doroshchuk NA, Kapralova IV, Bikanov RA, Ferdman DK, Zaletova VV. Childbirth in a patient with non-obstructive azoospermia and reciprocal chromosomal translocation (case report). *Russian Journal of Human Reproduction.* 2023;29(2):110-115. (In Russ.). DOI: 10.17116/repro202329021110
24. Salama N., Sirelkhatim Hassan O. Staged Laboratory Processing of Testicular Tissue in Non-Obstructive Azoospermia May Rescue Retrieving an Existing Sperm: A Case Report and Literature Review. *Clin Med Insights Case Rep.* 2023; 16:11795476231178353. DOI: 10.1177/11795476231178353
25. Amer M., Fakhry E. Fresh vs frozen testicular sperm for assisted reproductive technology in patients with non-obstructive azoospermia: A systematic review. *Arab J Urol.* 2021;19(3):247-254. DOI: 10.1080/2090598X.2021.1932303
26. O'Neill H.C., Nikoloska M., Ho H., Doshi A., Maalouf W. Improved cryopreservation of spermatozoa using vitrification: comparison of cryoprotectants and a novel device for long-term storage. *J Assist Reprod Genet.* 2019;36(8):1713-1720. DOI: 10.1007/s10815-019-01505-x
27. Ramasamy R., Fisher E.S., Ricci J.A., Leung R.A., Schlegel P.N. Duration of microdissection testicular sperm extraction procedures: relationship to sperm retrieval success. *J Urol.* 2011;185(4):1394-7. DOI: 10.1016/j.juro.2010.11.074

Вклад авторов

Е.Е. Захарова: разработка концепции и дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи, подготовка иллюстративного материала;
И.В. Капралова: получение данных для анализа, анализ полученных данных;
И.С. Кривохарченко: получение данных для анализа, анализ полученных данных;
О.О. Жарская: получение данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи;
Т.В. Картавенко: получение данных для анализа.

Authors contribution

E.E. Zakharova: development of the concept and design of the study, data obtaining, data analysis, review of publications on the topic of the article, article writing, preparation of illustrative material;
I.V. Kapralova: data obtaining, data analysis;
I.S. Krivokharchenko: data obtaining, data analysis;
O.O. Zharskaya: data obtaining, review of publications on the topic of the article;
T.V. Kartavenko: data obtaining.

ORCID авторов / ORCID of authors:

Е.Е. Захарова/ Zakharova E.E.: <https://orcid.org/0000-0002-8003-8636>
И.В. Капралова/ Kapralova I.V.: <https://orcid.org/0000-0003-2863-1667>
О.О. Жарская/ Zharskaya O.O.: <https://orcid.org/0000-0002-0661-3778>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The work was performed without external funding.