

# Новый подход к криоконсервации единичных сперматозоидов с применением SpermVD

Arie Berkovitz<sup>1,2,3</sup>, Michael Belenky<sup>4</sup> and Pavel Itsykson<sup>3</sup>

1) Department of Obstetrics and Gynecology, Meir Medical Center, Kfar-Saba, Israel. 2) Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel. 3) Assuta Medical Center, Tel Aviv, Israel. 4) MFC Male Fertility Center, Rishon LeZion, Israel.

## Введение:

Возможность криоконсервировать малые количества сперматозоидов человека играет ключевую роль в тяжелых случаях мужского бесплодия, особенно когда требуется хирургическое извлечение спермы. На протяжении многих лет предлагались различные методы криоконсервации единичных сперматозоидов, однако каждый из них имел недостатки, которые препятствовали широкому использованию в основном из-за трудоемких процедур подготовки и извлечения сперматозоидов. Таким образом, возникла необходимость в простом и удобном средстве хранения единичных сперматозоидов.

**SpermVD** – новое приспособление для криоконсервации единичных сперматозоидов.

- Изготавливается из медицинского поликарбоната методом литья под давлением с последующей радиостерилизацией гамма-излучением.
- Размер: 26 x 8 x 7 мм.
- Вес: 0,2 грамма.



Проспективное исследование 2015-2016 гг показало, что новый SpermVD – это эффективный и простой носитель для замораживания малого числа сперматозоидов в каплях с небольшим объемом. Он способствует сокращению времени поиска после размораживания с нескольких часов до минут, обеспечивая 96% выживаемость и последующее успешное использование сперматозоидов для оплодотворения.

Параметры исследования:

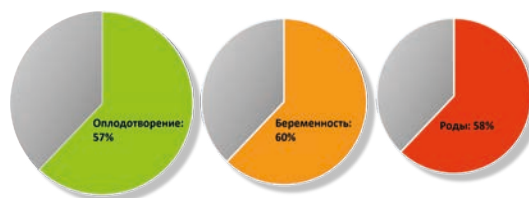
- У 15 пациентов диагностирована виртуальная азооспермия.
- 5 пациентов с IMSI-отобранными сперматозоидами.

## Методы:

После сбора сперму центрифугировали и отмыли. Для пациентов с диагнозом виртуальной азооспермии ресуспендированный осадок раскапывали в чашки Петри каплями по 10 мкл. Капли были тщательно исследованы на наличие сперматозоидов, и любые найденные сперматозоиды переносили в 1 мкл промывочной среды/криопротектора на SpermVD. Для пациентов с применением ИМСИ осуществляли селекцию сперматозоидов под увеличением  $\times 6000$  в чашке ИКСИ, и отобранные клетки аналогичным образом переносили в SpermVD. Затем SpermVD был погружен в жидкий азот. В день пункции SpermVD размораживали и помещали в чашку ИКСИ, а сперматозоиды извлекали из капель, отмывали и использовали для инъекции.

Характеристики	Среднее значение, стандартное отклонение, %
Возраст мужчин	37.5 ± 8.6
Возраст женщин	33.6 ± 8.6
Количество замороженных сперматозоидов	17.5 ± 10.5
Количество подвижных замороженных сперматозоидов	17.1 ± 11.1
Количество размороженных сперматозоидов	16.9 ± 10.2
Коэффициент выживаемости сперматозоидов	96.3%
Подвижные размороженные сперматозоиды	29%

## Клинические результаты:



## Выводы:

- SpermVD – подходящее средство криоконсервации и хранения единичных сперматозоидов.
- Использование SpermVD позволяет избежать проведения хирургической процедуры получения сперматозоидов в день пункции для пациентов с виртуальной азооспермией.
- SpermVD обеспечивает высокую выживаемость сперматозоидов, и так как были заморожены только подвижные сперматозоиды, оттаявшие неподвижные сперматозоиды считались живыми и пригодными для ИКСИ.
- применение SpermVD позволило минимизировать манипуляции с размороженными сперматозоидами, так как клетки были пригодны для ИКСИ сразу после размораживания.

## Прогноз:

- Несколько планшетов SpermVD могут быть использованы для хранения нескольких доз, полученных после одной TESE, и тем самым снизить вероятность проведения повторной TESE и криоконсервации ооцитов, а также сохранить оставшиеся неиспользованные сперматозоиды на будущее.
- SpermVD позволяет применять различные методы селекции сперматозоидов в группе пациентов с виртуальной азооспермией.
- При соответствующей подготовке персонала SpermVD может применяться как эффективное средство транспортировки криоконсервированных сперматозоидов между клиниками, в том числе расположенных в разных странах.

# Протокол использования

## Процедура витрификации сперматозоидов:

1. Соберите отдельные сперматозоиды в одну или несколько микрокапель среды для обработки, которые покрыты легким парафиновым маслом, в 50-100 мм культуральной чашке.
  2. В стерильных условиях извлеките SpermVD из пакета с помощью стерильного пинцета и поместите SpermVD на поверхность (можно использовать стерильную чашку Петри или крышку чашки Петри). (Рис. 1)
  3. Приготовьте раствор для криоконсервации спермы, смешав 1:1 среду для замораживания спермы и среду для отмывки спермы. Поместите три капли объемом 0.5-1 мкл капли данного раствора в центр обозначенных областей и незамедлительно перенесите SpermVD в культуральную чашку со сперматозоидами, подготовленными согласно пункту 1. Убедитесь, что капли криопротектора покрыты маслом. (Рис. 2)
  4. С помощью микроманипулятора, оснащенного пипеткой для инъекций, при 20-кратном увеличении перенесите отдельные сперматозоиды в одну или несколько капель криопротектора в SpermVD. (Рис. 3)
  5. Оставьте SpermVD со сперматозоидами на 15 минут при комнатной температуре.
  6. С помощью стерильного пинцета осторожно извлеките SpermVD с отдельными сперматозоидами из культуральной чашки, подождите, пока излишки масла стекут, и поместите его в пустую криопробирку объемом 1.8-2 мл, промаркированную этикеткой, устойчивой к жидкому азоту, или с помощью криомаркера, затем закройте ее пробкой. (Рис. 4).
- Рекомендация: не закручивайте пробку плотно, таким образом, жидкий азот постепенно заполнит криопробирку вскоре после погружения в него.
7. Поместите криопробирку со SpermVD на держатель для хранения и осторожно погрузите в жидкий азот для длительного хранения. (Рис. 5).

## Процедура размораживания:

1. Подготовьте культуральную чашку (50-100 мм) с каплями ПВП и среды для обработки спермы, которые покрыты маслом.
2. Извлеките криопробирку со SpermVD из жидкого азота непосредственно в условиях с комнатной температурой и оставьте ее закрытой на 5 минут при комнатной температуре.
3. С помощью стерильного пинцета перенесите SpermVD из криопробирки и поместите на чашку. Убедитесь, что капли со сперматозоидами покрыты маслом.
4. С помощью микроманипулятора, оснащенного пипеткой для инъекций, при 20-кратном увеличении перенесите сперматозоиды из SpermVD в капли среды для обработки спермы. (Рис. 6)

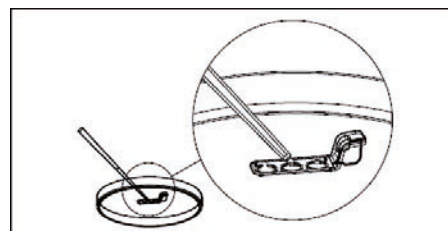


Рис. 1

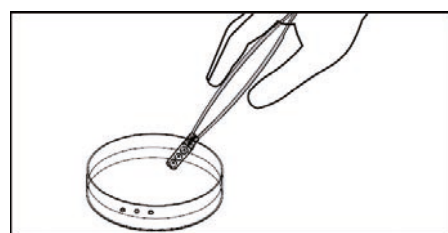


Рис. 2

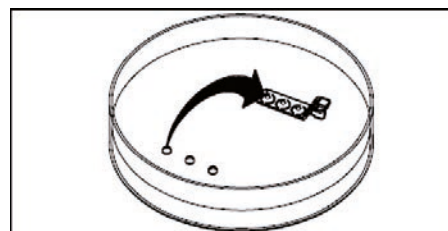


Рис. 3

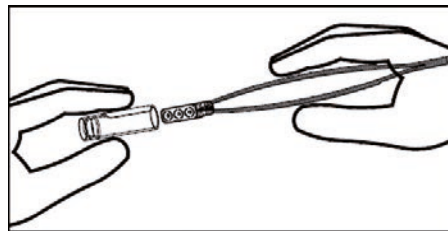


Рис. 4

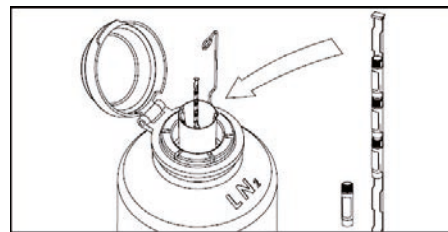


Рис. 5

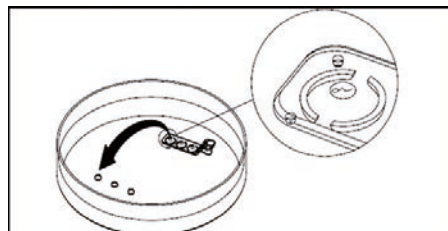


Рис. 6