

УДК: 611.013.12

DOI: 10.37800/RM.4.2021.43-47

## ТЕХНОЛОГИЯ ROSI: МИКРОИНЪЕКЦИЯ ГАПЛОИДНЫХ КРУГЛЫХ СПЕРМАТИД

А.Н. Магауия<sup>1</sup>, Х.Б. Жумадил<sup>1</sup>, Г.Р. Бекбосынова<sup>1</sup>, А.Б. Бегайдарова<sup>1</sup><sup>1</sup>ТОО “Экомед-Шымкент”, Шымкент, Республика Казахстан

### Аннотация

**Актуальность:** У большинства мужчин с азооспермией при Micro-TESE отсутствуют зрелые сперматозоиды, но обнаруживаются гаплоидные круглые сперматиды, которые можно ввести в ооциты, что приводит к оплодотворению.

**Цель исследования** - анализ научных работ по методу инъекции ооцитов круглыми сперматидами (Round spermatid injection, ROSI) и развития технологии ROSI.

**Методы:** Научные статьи отбирались путем поиска по ключевым словам в медицинских базах данных PUBMED, MEDLINE и EMBASE. Поиск осуществлялся по терминам “round spermatid injection” и “ROSI”.

**Результаты:** В статье рассмотрены несколько как успешных, так и нерезультативных исследований с применением технологии ROSI.

**Заключение:** Наш обзор позволяет сделать заключение, что технология ROSI является последним шансом для мужчин с необструктивной азооспермией, которые хотят использовать свой генетический материал, чтобы произвести потомство.

**Ключевые слова:** необструктивная азооспермия, мужское бесплодие, инъекция круглых сперматид, круглые сперматиды, ROSI

**Введение:** Азооспермия – тотальное отсутствие сперматозоидов в эякуляте. Она встречается у 10-15% мужчин, страдающих бесплодием [1] и делится на два вида – обструктивная (ОА) и необструктивная азооспермия (НОА). Пациентам с ОА проводят процедуру аспирации сперматозоидов из яичек (testicular sperm aspiration, TESA), чрескожной аспирации сперматозоидов из придатка яичка (percutaneous epididymal sperm aspiration, PESA) или микрохирургической аспирации сперматозоидов из придатка яичка (microsurgical epididymal sperm aspiration, MESA), при которых получают сперматозоиды из яичка или придатка яичка. По частоте наступления беременности, внутриплазматическая инъекция сперматозоида (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) из яичка или придатка яичка сравнима с инъекцией сперматозоидов из эякулята [2]. А при НОА лишь у 60% пациентов удаётся получить сперматозоиды методом микрохирургической экстракции сперматозоидов из тестикул (Micro-testicular sperm extraction, micro-TESE) [3]. Если это не удаётся, то такие мужчины считаются стерильными и им рекомендуют использование донорской спермы. Тем не менее, Tanaka и др. обнаружили, что биоптат некоторых пациентов с НОА, у которых не удалось получить сперматозоиды после Micro-TESE, содержит круглые сперматиды, которые могут дать им шанс на потомство благодаря разрабатываемой технологии инъекции круглых сперматид

(Round spermatid injection, ROSI) [4].

**Цель исследования** - анализ научных работ по методу инъекции ооцитов круглыми сперматидами (Round spermatid injection, ROSI) и развития технологии ROSI.

**Материалы и Методы:** Научные статьи для анализа отбирались путем поиска по ключевым словам в медицинских базах данных PUBMED, MEDLINE и EMBASE. Поиск осуществлялся по терминам “round spermatid injection” и “ROSI”.

### Результаты:

Edwards и др. в 1994 году предложили использовать сперматиды для ICSI у людей, когда отсутствуют сперматозоиды на более поздних стадиях [5].

В 1995 году Vanderzwalmen и др. [2] сообщили о первом случае оплодотворения яйцеклетки круглой сперматидой в поздней стадии у человека. Оплодотворенный ооцит впоследствии достиг стадии развития 4В.

В 1996 году Tesarik и др. [2] сообщили о рождении первых детей после применения ROSI. В исследовании приняли участие 6 бесплодных пар. В ходе исследования учёные провели микроинъекцию круглыми сперматидами 39 яйцеклеток, оплодотворение произошло у 14 из них. Один эмбрион достиг стадии 5 клеток. В общей сложности было перенесено 12 эмбрионов, которые привели к беременности у 2 пар. От первой беременности в сроке 39 недель родился мальчик весом 3500 г, а от второй – мальчик весом 3700 г в сроке 38 недель. Отличительной чертой их работы стало использование круглых сперматид из нативного эякулята. Сперматиды от других клеток дифференцировали по их форме, размеру, а также по форме и размеру ядра. Живые круглые сперматиды имели гладкие контуры, круглое ядро и равномерное распределение цитоплазмы вокруг ядра. У них отсутствовал хвост. У некоторых сперматид можно было различить образующуюся акросомную гранулу в виде яркого пятна рядом с клеточным ядром. Но у других видов круглых клеток рядом с ядром может образоваться вакуоль, которую можно спутать с акросомной гранулой круглых сперматид. Из этого следует, что наличие акросомной гранулы является важным, но не единственным критерием дифференциации круглых сперматид от других типов круглых клеток [2].

Vanderzwalmen и др. [3] в 1997 году провели еще одно исследование, в котором приняли участие 40 пациентов с ОА и НОА. Была проведена инъекция 296 ооцитов, у 57 из них произошло оплодотворение. В результате этих переносов было получено 5 беременностей. Три из них окончились рождением здоровых младенцев, одна – выкидышем, а исход последней беременности неизвестен. Авторы сообщают, что инкубация ооцитов с кальций ионофором на 15 минут при температуре 37°C сразу после инъекции повышает шанс оплодотворения (36% при инкубации с кальций ионофором и 16% – без инкубации).

Дифференциацию круглых сперматид от других клеток проводили по таким признакам, как круглая форма с гладкими контурами и размер (диаметр – 7,8 мкм). По диаметру они были похожи на эритроциты (диаметр – 7,2 мкм) и некоторые маленькие лимфоциты. В круглых сперматиде аппарат Гольджи было очень сложно идентифицировать с контрастной системой Хоффмана. Единственным их отличительным признаком является центральное округлое утолщение ядра. А плотное вещество в форме полумесяца рядом с цитоплазматической мембраной является признаком сперматиды с акросомой (Фаза КЭП). Наличие формирующейся акросомы является хорошим критерием и в некоторых клетках её можно увидеть в виде выпячивания на одном конце клетки.

Antinori с коллегами опубликовали две работы по ROSI в 1997 году. В первой работе рассматриваются 2 мужчин с азооспермией. После процесса заморозки-разморозки 70% круглых сперматид оказались живыми и пригодными для микроинъекции. Была проведена инъекция 15 ооцитов, оплодотворение произошло у 7 из них. 6 эмбрионов достигли стадии 4- и 6-клеток. Исследование окончилось одной беременностью. Вторая работа была более масштабной: в ней приняли участие 19 мужчин с необструктивной азооспермией. Из 135 ооцитов, инъекцированных круглыми сперматидами, оплодотворились 75. Перенос 56 эмбрионов привел к 2 беременностям [2].

В исследовании Barak и коллег 1998 метод ROSI был применен у 6 пар, у которых бесплодие было связано с мужским фактором. Общая численность проведенных циклов ЭКО – 8, в которых была проведена инъекция круглыми сперматидами 37 ооцитов. Оплодотворились 23 ооцита, из которых в конечном итоге была получена одна беременность. Особенностью этой работы является то, что все перенесенные 4 эмбриона (2-4 клеточные), полученные после микроинъекции, были с одним пронуклеусом (1PN). Через 40 недель родился здоровый мальчик (3090г.) [3]. Введенные в ооциты круглые сперматиды были на стадии Sa согласно классификации de Kretser and Kerr [6].

Gianaroli и соавторы [3] провели ROSI у пары, где у мужчины был обнаружен маленький объем яичек (>15 мл) и повышенный уровень ФСГ (>12 мМЕ/мл). В процессе исследования была проведена заморозка-разморозка тестикулярной ткани, полученной после гистологической биопсии. Через 4 месяца при разморозке биоптата были обнаружены только живые круглые сперматиды, которые использовались для микроинъекции 5 ооцитов. Оплодотворение произошло у 2 ооцитов, которые в дальнейшем достигли стадии 3- и 4-клеток и были перенесены. В сроке 40 недель родилась здоровая девочка (3350г) с нормальными кариотипом и фенотипом. Через год после рождения у ребенка психическое и физическое развитие соответствовало норме. Дифференциацию круглых сперматид проводили по внешним признакам, указанным предыдущими авторами. Данная работа показывает, что для ROSI при ЭКО возможно использование криоконсервированного тестикулярного биоптата.

В конце 90-х – начале 2000-х годов целый ряд ученых безуспешно пытались реплицировать успех предшественников. К сожалению, ни в одном из исследований не были

получены удовлетворительные результаты (отсутствие беременностей) [2].

Настоящим прорывом в этой области стали работы Tanaka и коллег [4]. В 2015 году они сообщили о рождении 14 детей от 12 женщин после ROSI. У пациентов с НОА после Micro-TESE не были обнаружены сперматозоиды или удлиненные сперматиды, но были найдены округлые клетки, напоминающие круглые сперматиды. Семенные каналцы в биоптатах были ферментативно обработаны и криоконсервированы для дальнейшего использования в ROSI. Круглые сперматиды были в первую очередь идентифицированы микроскопическим исследованием по размеру и морфологии. Круглые сперматиды по размеру были меньше других клеток сперматогенеза (диаметр – 6-8 мкм). Выступающие активные псевдоподии были обнаружены на других клетках сперматогенеза, но не на круглых сперматиде. Акросомальная везикула – безусловное доказательство того, что клетка является круглой сперматидой – была обнаружена лишь у 10% круглых клеток. Ещё одной важной отличительной чертой круглых сперматид является то, что их ядро можно с лёгкостью отделить от самой клетки путём непрерывного пипетирования. Например, несмотря на внешнее сходство с круглыми сперматидами, ядро других клеток сперматогенеза труднее отделить от клетки. Лимфоциты, имеющие такой же размер, как круглые сперматиды, имеют более “крепкую” клеточную мембрану, целостность которой нельзя нарушить пипетированием. Впоследствии был определен кариотип этих клеток с помощью FISH, которая подтвердила высокую точность микроскопического определения сперматид. Известно, что сам процесс микроинъекции может вызвать активацию ооцитов, но не всех случаях. Авторы выяснили, что при комбинировании ROSI со стимуляцией ооцитов электрическим током достигается наивысшая концентрация ионов кальция в ооплазме в сравнении с другими методами. Они также подчеркнули, что электрическая стимуляция благоприятно влияет на развитие эмбриона, поэтому в ходе исследования все ооциты подвергались стимуляции электрическим током за 10 минут до ROSI.

В 2018 году Танака и коллеги опубликовали свою вторую работу о ROSI, в которой сообщается о рождении 90 детей от 83 семейных пар (14 детей из предыдущего исследования тоже входят в это число) [7]. Второе исследование сосредоточено больше на физическом и психическом развитии детей, рожденных после ROSI. Ученые проводили регулярное наблюдение за детьми до двухлетнего возраста. Трое младенцев имели врожденные дефекты: дефект межжелудочковой перегородки, заячья губа и пупочная грыжа. Первый дефект закрылся спонтанно без хирургического вмешательства, а заячья губа и пупочная грыжа были устранены посредством операции. Не считая этого, физическое и психическое развитие детей, рожденных после ROSI, никак не отличалось от таковых здоровых детей в первые 2 года жизни.

В 2021 году Hanson и коллеги провели метаанализ ROSI, в котором приняли участие 22 исследования, 1099 семейных пар и 4218 перенесенных эмбрионов. Согласно этому метаанализу, частота оплодотворения при ROSI составляет 38,7%, частота беременности – 3,7%. До родов

дошли лишь 4,3% перенесенных эмбрионов [8].

**Обсуждение:** Одной из главных причин низких показателей ROSI является отсутствие точных методов идентификации круглых сперматид и их дифференциации от других круглых клеток. Сейчас основными методами является дифференциация по размеру и морфологии. Разработка более точных техник идентификации круглых сперматид позволило бы значительно улучшить эффективность ROSI. Одним из решений этой проблемы могло бы быть применение принципа магнитной клеточной сортировки с помощью антител с ферромагнитными частицами, специфичными к рецепторам на поверхности круглых сперматид.

Еще одним проблемным шагом является активация ооцита. Как видно из упомянутых исследований с низкими результатами, нельзя полагаться только на ROSI для активации. Необходимо применять дополнительные методы.

Одним из таких методов является стимуляция электрическим током, которая позволила Tanaka и его коллегам совершить прорыв в области ROSI. Еще одним многообещающим методом для активации ооцита является применение фосфолипазы C зета (PLC $\zeta$ ), которую уже применяют при других видах ВРТ [9-11].

**Заключение:** Инъекция круглых сперматид (ROSI) показала себя, как вселяющий надежду метод, который может быть применен в качестве ВРТ у мужчин с НОА в целях достижения беременности с использованием их собственного генетического материала. Но в настоящее время данная процедура имеет более низкую эффективность, чем при применении зрелых сперматозоидов, и нуждается в дальнейшем усовершенствовании.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cocuzza M., Alvarenga C., Pagani R. The epidemiology and etiology of azoospermia // *Clinics (Sao Paulo)*. – 2013. – Vol. 68 Suppl 1(Suppl 1). – P. 15-26. [https://doi.org/10.6061/clinics/2013\(sup01\)03](https://doi.org/10.6061/clinics/2013(sup01)03);
2. Gross K.X., Hanson B.M., Hotaling J.M. Round Spermatozoa Injection // *Urol. Clin. North Am.* – 2020. – Vol. 47(2). – P. 175-183. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2019.12.004>;
3. Tekayev M., Vuruskan A.K. Clinical values and advances in round spermatozoa injection (ROSI) // *Reprod. Biol.* – 2021. – Vol. 21(3). – No. 100530. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2021.100530>;
4. Tanaka A., Nagayoshi M., Takemoto Y., Tanaka I., Kusunoki H., Watanabe S., Kuroda K., Takeda S., Ito M., Yanagimachi R. Fourteen babies born after round spermatozoa injection into human oocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2015. – Vol. 112(47). – P. 14629-14634. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517466112>;
5. Edwards R.G., Tarin J.J., Dean N., Hirsch A., Tan S.L. Are spermatozoa injections into human oocytes now mandatory? // *Hum. Reprod.* – 1994. – Vol. 9(12). – P. 2217-2219. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138426>;
6. Kerr J.B., Loveland K.A.L., O'Bryan M.K., de Kretser D.M. Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms // In: J.D. Neill, J.R.G. Challis, D.M. de Kretser, D.W. Pfaff, J.S. Richards, T.M. Plant, P.M. Wassarman (Eds.). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. – 3 ed. – Elsevier, 2006. – P. 827 - 947;
7. Tanaka A., Suzuki K., Nagayoshi M., Tanaka A., Takemoto Y., Watanabe S., Takeda S., Irahara M., Kuji N., Yamagata Z., Yanagimachi R. Ninety babies born after round spermatozoa injection into oocytes: survey of their development from fertilization to 2 years of age // *Fertil Steril.* – 2018. – Vol. 110(3). – P. 443-451. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.04.033>;
8. Hanson B.M., Kohn T.P., Pastuszak A.W., Scott R.T. Jr., Cheng P.J., Hotaling J.M. Round spermatozoa injection into human oocytes: a systematic review and meta-analysis // *Asian J. Androl.* – 2021. – Vol. 23(4). – P. 363-369. [https://doi.org/10.4103/aja.aja\\_85\\_20](https://doi.org/10.4103/aja.aja_85_20);
9. Amdani S.N., Jones C., Coward K. Phospholipase C zeta (PLC $\zeta$ ): oocyte activation and clinical links to male factor infertility // *Adv. Biol. Regul.* – 2013. – Vol. 53(3). – P. 292-308. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2013.07.005>;
10. Kashir J., Heindryckx B., Jones C., De Sutter P., Parrington J., Coward K. Oocyte activation, phospholipase C zeta and human infertility // *Hum. Reprod. Update.* – 2010. – Vol. 16(6). – P. 690-703. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmq018>;
11. Ramadan W.M., Kashir J., Jones C., Coward K. Oocyte activation and phospholipase C zeta (PLC $\zeta$ ): diagnostic and therapeutic implications for assisted reproductive technology // *Cell Commun. Signal.* – 2012. – Vol. 10(1). – No. 12. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-10-12>.

## ROSI ТЕХНОЛОГИЯСЫ: ГАПЛОИДТЫ ДӨҢГЕЛЕК СПЕРМАТИДТЕР МИКРОИНЪЕКЦИЯСЫ

Ә.Н. Мағауия<sup>1</sup>, Х.Б. Жұмаділ<sup>1</sup>, Г.Р. Бекбосынова<sup>1</sup>, А.Б. Бегайдарова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ЖШС “Экомед-Шымкент”, Шымкент, Республика Казахстан

### Түйін

**Мақаланың өзектілігі:** Азооспермиясы бар көптеген пациенттерге Micro-TESE процедурасынан кейін жетілген сперматозоидтер табылмай, гаплоидты дөңгелек сперматозоидтер табылады. Бұл сперматозоидтерды ооциттерге инъекция жасау ұрықтандыруға алып келеді.

**Мақсаты:** дөңгелек сперматозоидтерді ооцитке инъекция жасау (Round spermatid injection, ROSI) технологиясы туралы ғылыми мақалалар анализі.

**Материалдар мен әдістер:** Ғылыми мақалалар PUBMED, MEDLINE және EMBASE сияқты медициналық дерекқорларынан алынды. Мақалаларды іздеу мақсатында “round spermatid injection” және “ROSI” секілді түйін сөздер қолданылды.

**Нәтижелер:** Бұл мақалада біз ROSI технологиясын сәтті және сәтсіз қолданылуын сипаттайтын зерттеулерді талқыладық.

**Қорытынды:** Біздің шолу ROSI технологиясын ұрпақ жалғастыру үшін өз генетикалық материалын қолданғысы келетін обструктивті емес азооспермиясы бар адамдар үшін соңғы үміт болып табылатынын көрсетті.

**Түйін сөздер:** обструктивті емес азооспермия, еркек бедеулігі, дөңгелек сперматидтер инъекциясы, дөңгелек сперматидтер, ROSI

## ROSI TECHNOLOGY: INJECTION OF HAPLOID ROUND SPERMATIDS

A.N. Magaiya<sup>1</sup>, Kh.B. Zhumadil<sup>1</sup>, G.R. Bekbosynova<sup>1</sup>, A.B. Begaidarova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ecomed-Shymkent LLC, Shymkent, the Republic of Kazakhstan

### Abstract

**Relevance:** According to micro-testicular sperm extraction (Micro-TESE) results, many azoospermic men have no mature spermatozoa but possess haploid round spermatids that can be injected into oocytes and lead to fertilization.

**The purpose was** a systematic review of articles on round spermatid injection technique (ROSI).

**Methods:** Articles on ROSI were searched in medical databases like PUBMED, MEDLINE, and EMBASE by the keywords “round spermatid injection” and “ROSI.”

**Results:** The article offers a review of several successful and unsuccessful cases of using the ROSI technique.

**Conclusion:** According to our review, the ROSI technique can serve as a last resort for men with nonobstructive azoospermia eager to use their genetic material to procreate.

**Keywords:** nonobstructive azoospermia, male infertility, round spermatid injection, round spermatids, ROSI

### Данные авторов

**Магауия Э.Н.**, сотрудник андрологической лаборатории ТОО “Экомед-Шымкент”,  
orda.ezhenid@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4584-7737>;

**Жұмаділ Х.Б.** (автор для корреспонденции), сотрудник андрологической лаборатории  
ilktarm@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2900-2830>;

**Бекбосынова Г.Р.**, эмбриолог ТОО “Экомед-Шымкент”, b\_g\_r@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2621-6278>;

**Бегайдарова А.Б.**, эмбриолог ТОО “Экомед-Шымкент”, aidana2514352@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0083-9274>

**Адрес для корреспонденции:** Жұмаділ Х.Б., ТОО “Экомед-Шымкент”, Проспект Назарбаева 16,  
г. Шымкент, Казахстан.

### Вклады авторов:

вклад в концепцию – **Магауия А.Н., Жұмаділ Х.Б., Бекбосынова Г.Р., Бегайдарова А.Б.**,

научный дизайн – **Бекбосынова Г.Р., Бегайдарова А.Б.**,

исполнение заявленного научного исследования – **Магауия А.Н., Жұмаділ Х.Б.**,

интерпретация заявленного научного исследования – **Бекбосынова Г.Р., Бегайдарова А.Б.**,

создание научной статьи – **Магауия А.Н., Жұмаділ Х.Б.**

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.