JOURNAL FÜR
FERTILITÄT UND REPRODUKTION

SPERLING H, KATZORKE TH, KOLODZIEJ FB, LÜMMEN G, PROPPING D, RÜBBEN H
SCHNEIDER T, WILLMS E

MESA/TESE: Ergebnisse der Kryokonservierung im Vergleich zur Verwendung "frischer" Spermatozoen zur assistierten Reproduktion

Journal für Fertilität und Reproduktion 2000; 10 (3) (Ausgabe für Österreich), 30-34

Homepage:

www.kup.at/fertilitaet

**Online-Datenbank mit
Autoren- und Stichwortsuche**

ZEITSCHRIFT FÜR IN-VITRO-FERTILISIERUNG, ASSISTIERTE REPRODUKTION UND KONTRAZEPTION

Indexed in EMBASE/
Excerpta Medica

Krause & Pachernegg GmbH · VERLAG für MEDIZIN und WIRTSCHAFT · A-3003 Gablitz

H. Sperling, G. Lümmen, T. Schneider, T. Katzorke, D. Propping, E. Willms, F. B. Kolodziej, H. Rübben

MESA/TESE: Ergebnisse der Kryokonservierung im Vergleich zur Verwendung „frischer" Spermatozoen zur assistierten Reproduktion

Summary

The use of epididymal or testicular spermatozoa is a well established procedure in assisted reproduction. The cryopreservation of the retrieved sperm shows advantages for the patients and the IVF-team. The patient benefits due to the possibility of just one operation with several possible IVF-procedures and the IVF-team has the logistic advantages. We discuss the efficacy and safety of the cryopreservation of epididymal and testicular spermatozoa in assisted reproduction. Our data showed in 13/57 MESA-ICSI and 14/69 TESE-ICSI cycles with fresh spermatozoa a following pregnancy. Twelve of 13 pregnancies after MESA and 9/14 pregnancies after TESE ended successful. In the case of cryopreservation 4/30 MESA and 11/28 TESE cycles ended with pregnancy. Live birth rate in this group was 1 out of 4 pregnancies after MESA and 7/11 after TESE. Statistical analysis with Fisher's exact-test shows a significant difference of 0.036 ($p < 0.05$) for the use of cryopreserved spermatozoa after TESE. This results underline the necessity of cryopreservation in modern assisted reproduction units. At this time it remains unclear, whether epididymal or testicular spermatozoa are better used for cryopreservation.

Die Verwendung operativ gewonnener Spermatozoen zur assistierten Reproduktion stellt ein Standardverfahren dar. Die Anwendung der Kryokonservierung hat sowohl logistische Vorteile, da die notwendige Abstimmung des Operationszeitpunktes mit der Eizellentnahme entfällt, als auch vor allem den Vorteil eines möglichst einmaligen operativen Vorgehens mit mehreren resultierenden Stimulationszyklen. Vorgestellt wird eine Überprüfung der Effizienz und Therapiesicherheit der Kryokonservierung epididymaler und testikulärer Spermatozoen im Rahmen der assistierten Reproduktion. Bei der Verwendung von „frischen" Spermatozoen zeigte sich in unserem Patientengut bei 13/57 MESA-ICSI und 14/69 TESE-ICSI eine nachfolgende Schwangerschaft. Es wurden 12/13 MESA-Graviditäten und 9/14 TESE-Graviditäten erfolgreich beendet. Bei den kryokonservierten Spermien führten 4/30 MESA/ICSI-Zyklen und 11/28 TESE/ICSI-Zyklen zum Eintreten einer Schwangerschaft. Erfolgreich beendet wurde 1 von 4 MESA- und 7/11 TESE-Graviditäten. Beim statistischen Vergleich mittels Fisher's exact-Test zeigt sich für TESE-Kryo / MESA-Kryo ein signifikanter Unterschied von 0,036 ($p < 0,05$), ohne daß in den anderen Vergleichsgruppen ein signifikanter Unterschied nachzuweisen gewesen ist. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse läßt sich – auch im Literaturvergleich – festhalten, daß die operative Spermiengewinnung nur mit der gleichzeitigen Möglichkeit der Kryokonservierung durchgeführt werden sollte. Inwieweit epididymale oder testikuläre Spermatozoen für die Kryokonservierung besser geeignet sind, bleibt zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch ungeklärt.

Einleitung

1984 wurde erstmals eine operative Spermatozoenentnahme mit anschließender in vitro Fertilisation (IVF), nach zuvor erfolglos durchgeführter Refertilisierung, von Temple-Smith durchgeführt, nachdem die IVF zunächst nur bei gynäkologischem Faktor angewendet worden war. Nach der MESA (mikrochirurgische epididymale Spermienaspiration) konnten motile, normal konfigurierte Spermatozoen nachgewiesen werden, die zur Fertilisation einer Oozyte führten [1]. Der wirkliche Durchbruch bei der Verwendung operativ gewonnener Spermien ergab sich jedoch erst durch die Entwicklung der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) 1992 durch Palermo [2].

Durch die ICSI ist es möglich, auch bei einzelnen Spermatozoen durch die Mikroinjektion Fertilisationen der Eizellen zu erzielen, so daß auch bei Spermiogeneseeinschränkungen Schwangerschaften und Geburten erzielt werden können. Dies zeigt sich um so deutlicher bei im Ejakulat nach-

gewiesener Azoospermie mit hochgradigen Spermiogenesestörungen, bei der es möglich ist, durch den Einsatz der TESE (Testikuläre Spermienextraktion) einzelne Spermatozoen oder auch Spermatiden zu gewinnen, die dann durch die Anwendung der ICSI zu Befruchtungen führen [3, 4].

Durch die Möglichkeit der Kryokonservierung von Samenzellen, Eizellen und auch befruchteten Eizellen zeigt sich eine weitere Dimension in den Möglichkeiten der assistierten Reproduktion [5]. Die Kryokonservierung von Spermatozoen gibt die Möglichkeit, die Therapie der Partner zeitlich zu entkoppeln, was logistische Vorteile bietet und dem Partner die Möglichkeit eröffnet, bei der operativen Intervention des jeweils anderen anwesend zu sein.

Ziel dieser Arbeit ist die Darstellung der Ergebnisse in bezug auf die Effizienz der Verfahren und die Therapiesicherheit. Diskutiert werden die daraus resultierenden Möglichkeiten der Verwendung von operativ gewonnenen Samenzellen in Verbindung mit der Kryokonservierung innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe und der Literatur.

Methodik

In der Untersuchung der eigenen Ergebnisse wurden 184 konsekutive Stimulationszyklen mit nachfolgender Anwendung der ICSI bei 132 Patientinnen nach vorheriger operativer Spermienentnahme evaluiert. Das Alter der Patientinnen lag in beiden Gruppen zwischen 22 und 41 Jahren mit einem Median von 27 Jahren. Verglichen werden 69 „frische“ TESE/ICSI und 57 „frische“ MESA/ICSI-Zyklen sowie 58 ICSI-Zyklen mit kryokonservierten Spermien (30 MESA und 28 TESE). Mit „frisch“ werden die Zyklen bezeichnet, bei denen nach vorherigem Spermatozoennachweis in einer diagnostischen Hodenbiopsie die MESA oder TESE am gleichen Tag wie die Eizellentnahme bei der Frau durchgeführt worden ist [6]. Die Kryokonservierung der Spermatozoen erfolgt im IVF-Labor unter Verwendung eines industriellen Kryoprotektivums. Die Proben werden nach Lagerung im Flüssigstickstoff vor der ICSI im Wasserbad aufgetaut. Bei der Verwendung kryokonservierter Hodenbiopsien werden diese nach 3-minütigem Auftauen mit 1 ml Ham's F10 in einer Petrischale versetzt und mechanisch aufgearbeitet. Nach Inkubation bei 37 °C über 90 min. wird die Probe nochmals mechanisch zerteilt und erneut für 30–60 min. inkubiert. Nach Zentrifugation werden die Spermatozoen im Sediment zur ICSI verwendet. Bei der Kryokonservierung und Aufarbeitung der kryokonservierten Proben zeigen sich im Vergleich zu anderen Arbeitsgruppen graduelle Unterschiede. Weit verbreitet ist neben der mechanischen Aufarbeitung der Hodenpropben die enzymatische mit Hyaluronidase und sogar eine elektrische Aufarbeitung [5, 7, 8]. Das Auffinden vitaler Spermatozoen läßt sich durch die Zugabe von Pentoxifyllin erleichtern, da eine Motilitätssteigerung auch bei testikulärem Ursprung möglich ist [9]. Die Kryokonservierung epididymaler Spermatozoen erfolgt nach Dichtegradientenzentrifugation in gleiche Volumina von Spermatozoen und Kryoprotektivum in allen Arbeitsgruppen in gleicher Weise. Unterschiede zeigen sich nur bei den verwendeten, industriell hergestellten Kryoprotektiva [7, 10].

Ergebnisse

Bei der Kryokonservierung operativ gewonnener Spermatozoen zeigen sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch widersprüchliche Ergebnisse. Oates et al. und Silber et al. konnten für epididymale Spermatozoen keine signifikanten Änderungen der Schwangerschaftsraten nach der Kryokonservierung aufzeigen [11, 12]. Bei testikulären Spermatozoen zeigte sich bei der Brüsseler Arbeitsgruppe um van Steirteghem eine gleichbleibende Fertilisationsrate mit kryokonservierten Spermatozoen, die Teilungsrate der Oozyten war vermindert [13]. In unserer Arbeitsgruppe wurden nach der Verwendung „frischer“ Spermatozoen in 13/57 (22,8 %) MESA/ICSI und 14/69 (20,2 %) TESE/ICSI-Zyklen klinische Schwangerschaften erzielt. Von diesen Schwangerschaften wurden 12/13 MESA-Graviditäten und 9/14 TESE-Graviditäten erfolgreich beendet. Bei den Stimulationszyklen nach Kryokonservierung der Spermatozoen führten 4/30 (13,3 %) MESA/ICSI und 11/28 (39,2 %) der TESE/ICSI-Zyklen zu einer klinischen Schwangerschaft. Hiervon wurde 1 von 4 Graviditäten nach Kryo-MESA und 7/11 Graviditäten nach Kryo-TESE erfolgreich beendet. Beim statistischen Vergleich der einzelnen Verfahren ergibt sich ein signifikanter Unterschied bei der Verwendung kryokonservierter Sper-

matozoen für die testikulären Spermatozoen. Bei der Schwangerschaftsrate ergibt sich ein p-Wert von 0,036 und bei der Geburtenrate von 0,023 (Tab. 1).

Diskussion

Die Kryokonservierung operativ gewonnener Spermatozoen – gleich welchen Ursprungs – gehört in der modernen Reproduktionsmedizin mittlerweile zu einem der Mindeststandards. Sowohl mit epididymalen als testikulären Spermatozoen zeigen sich akzeptable Schwangerschafts- und Geburtenraten im Vergleich mit den ESHRE-Task Force Daten (Tab. 2) [14]. Die Ergebnisse weisen jedoch noch unterschiedliche Tendenzen auf. Bei den epididymalen Spermatozoen findet sich nach der Kryokonservierung keine verminderte Schwangerschaftsrate, bei den testikulären Spermatozoen hingegen zeigte sich eine verminderte Teilungsrate der fertilisierten Eizellen [11–13]. Diese Ergebnisse konnten wir in unserem eigenen Patientenkollektiv hingegen nicht bestätigen. Hier liegen bei der Verwendung kryokonservierter testikulärer Spermatozoen sowohl die Schwangerschafts- als auch die Geburtenrate signifikant besser als bei der Verwendung von Samenzellen aus dem Nebenhoden (Tab. 1).

Mit diesen Ergebnissen läßt sich zeigen, daß ein metachrones Vorgehen unter Nutzung der Kryokonservierung nicht nur möglich ist, sondern auch äquieffektiv. Die Anlage des Kryodepots scheint um so wichtiger unter dem Aspekt der Notwendigkeit zum wiederholten Eingriff, wie sie im Rahmen der assistierten Reproduktion notwendig werden kann. Bei der MESA ist es möglich, nach einer einzigen operativen Maßnahme bis zu 25 konsekutive ICSI-Zyklen, im Mittel 7 Zyklen, durchzuführen [15]. Im Gegensatz hierzu müssen die Ergebnisse am Hoden gesehen werden, bei der es nach Mehrfach-TESE zu Minderperfusionen des Hodengewebes und passageren Testosteronabfällen gekommen ist [16, 17].

Tierexperimentell konnte gezeigt werden, daß nach Hodenbiopsien das Volumen der entstandenen Parenchymnarbe bis zu dreimal so groß war wie das Volumen der entnommenen Biopsie, dies ist um so bedeutender, als daß bei Patienten mit testikulärer Azoospermie häufig reduzierte Hodenvolumina vorliegen [18].

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die Kryokonservierung operativ gewonnener Spermatozoen jedweden Ursprungs in der modernen Reproduktionsmedizin ein Standard sein muß, da nicht nur logistische Vorteile für das Reproduktionsteam entstehen, sondern und vor allem den Patienten die Möglichkeit gegeben ist, dem Partner z. B. bei der Eizellentnahme beizustehen und Mehrfachoperationen verhindert werden können. Ob testikuläre oder epididymale Spermatozoen besser kryokonserviert werden können, bleibt zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch unklar, soll aber nichts am grundsätzlichen Ja zur Kryokonservierung ändern.

Literatur:

1. Temple-Smith PD, Southwick CA, Yates CA, Trounson AO, de Kretser DM. Human pregnancy by in vitro fertilisation using sperm aspirated from the epididymis. J In Vitro Fert Embryo Transf 1985; 2: 119–22.
2. Palermo G, Joris H, Devroey P, van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992; 340: 17–8.
3. Antinori S, Versaci C, Dani G, Antinori M, Pozza D, Selman HA. Fertilization with human testicular spermatids: four successful pregnancies. Hum Reprod 1997; 12: 289–91.
4. Staessen C, Coonen E, van Assche E, Tournaye H, Joris H, Devroey P, van Steirteghem AC, Liebaers I. Preimplantation diagnosis for X and Y normality in embryos from three klinefelter patients. Hum Reprod 1996; 11: 1650–3.
5. Salzbrunn A, Benson DM, Holstein AF, Schulze W. A new concept for the

Tabelle 1: Essener Ergebnisse [6]

	„Frisch“	Kryokonserviert
Gravidität		
MESA	13/57	4/30
TESE	14/69	11/28
		p = 0,036
Geburten		
MESA	12/57	1/30
TESE	9/69	7/28
		p = 0,023

Tabelle 2: Ergebnisse der ICSI – ESHRE ICSI Task Force 1993–1995 [14]: Schwangerschaftsrate nach ICSI in Abhängigkeit vom Spermienursprung

	Ejakulat	Nebenhoden	Hoden
ESHRE	21 %	22 %	19 %
Essen „Frisch“		22,8 %	20,2 %
Kryo		13,3 %	39,2 %

Dr. med. Herbert Sperling

Geboren 1964 in Bochum. Von 1991–1992 an der Chirurgischen Klinik der Ruhr-Universität Bochum am St. Josef-Hospital (Direktor: Prof. Dr. Zumtobel) tätig. Seit 1992 an der Urologischen Klinik und Poliklinik der Universität-Gesamthochschule Essen (Direktor: Prof. Dr. Rübben) tätig. 1994 Dissertation zum Thema „Die Wertigkeit des TAT (Thrombin-Antithrombin III-Komplex) -Tests in der Bewertung perioperativer Blutgerinnungsstörungen" (Ruhr-Universität Bochum, Prof. Dr. Zumtobel). Facharztprüfung 1996 (Ärztekammer Nordrhein, Düsseldorf). Mitgliedschaften: Deutsche Gesellschaft für Urologie, Deutsche Gesellschaft für Andrologie, Arbeitskreis Mikrochirurgie der Deutschen Gesellschaft für Urologie (Aufnahme September 1995), Arbeitskreis Andrologie der Deutschen Gesellschaft für Urologie (Aufnahme September 1997).

Korrespondenzadresse:
Dr. Herbert Sperling
Urologische Klinik der Universität Essen
D-45122 Essen, Hufelandstraße 55
e-mail: herbert.sperling@uni-essen.de

extraction of testicular spermatozoa as a tool for assisted fertilization (ICSI). Hum Reprod 1996; 11: 752–5.
6. Sperling H, Lümmen G, Katzorke T, Propping D, Wilms E, Kolodziej FB, Rübben H. MESA/TESE: Ergebnisse der Kryokonservierung im Vergleich zur Verwendung „frischer" Spermatozoen zur assistierten Reproduktion. Urologe A 1999; 38 (Suppl): S 15.
7. Schroeder-Printzen I, Köhn FM, Ludwig M, Weidner W. Mikrochirurgische Epididymale Spermatozoen Aspiration (MESA) und Testikuläre Spermatozoen Extraktion (TESE) – Eine Übersicht. Akt Urol 1997; 28: 251–9.
8. Verheyen G, de Croo I, Tournaye H, Pletinex I, Devroey P, van Steirteghem A. Comparison of four mechanical methods to retrieve spermatozoa from testicular tissue. Hum Reprod 1995; 10: 2956–9.
9. Köhn FM, Schroeder-Printzen I, El Mulla KF, Jung A, Stalf T, Weidner W, Gips H, Schill WB. Andrological work up of patients undergoing microsurgical epididymal sperm aspiration or testicular sperm extraction. Andrologia 1996; X (Suppl. 1): 77–81.
10. Devroey P, Silber SJ, Nagy ZP, Liu J, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, van Steirteghem A. Ongoing pregnancies and birth after intracytoplasmic sperm injection with frozen-thawed epididymal spermatozoa. Hum Reprod 1995; 10: 903–5.
11. Oates RD, Lobel SM, Harris DH, Pang S, Burgess CM, Carson RS. Efficacy of intracytoplasmatic sperm injection using intentionally cryopreserved epididymal spermatozoa. Hum Reprod 1996; 11: 133–8.
12. Silber SJ, Nagy ZP, Liu J, Tournaye H, Lissens W, Ferec C, Liebaers I, Devroey P, van Steirteghem AC. The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: the genetic implications for male infertility. Hum Reprod 1995; 10: 2031–43.
13. Verheyen G, Nagy ZP, Joris H de Croo I, Wieme P, Tournaye H, van Steirteghem A. Quality of frozen-thawed testicular spermatozoa and ICSI in matured germinal vesicle-stage oocytes. Hum Reprod 1996; 11 (Suppl): Abstract P030.
14. Tarlatzis BC, Bili H. Survey on intracytoplasmic sperm injection: report from the ESHRE ICSI Task Force. European Society of Human Reproduction and Embryology. Hum Reprod 1998; 13 (Suppl 1): 165–77.
15. Schroeder-Printzen I, Zumbé J, Bispink L, Paim S, Schneider U, Schröter D, Steinmeyer E, Engelmann U, Weidner W. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using cryopreserved epididymal spermatozoa in patients with non-reconstructable, obstructive azoospermia: aspirate analysis and outcome. J Urol 1997; 157 (Suppl.): Abstract 660.
16. Manning M, Jünemann KP, Alken P. Decrease in testosterone blood concentrations after testicular sperm extraction for intracytoplasmic sperm injection in azoospermic men. Lancet 1998; 352: 9121.
17. Schlegel PN, Su LM. Physiological consequences of testicular sperm extraction. Hum Reprod 1997; 12: 1688–92.
18. Schütte B. Hodenbiopsie bei Subfertilität. In: Schirren C, Holstein AF (Hrsg.). Fortschritte der Andrologie. Band 9. Grosse Verlag Berlin, 1984; 23–46.

NEUES AUS DEM VERLAG

Abo-Aktion zum Kennenlernen

Wenn Sie Arzt sind, in Ausbildung zu einem ärztlichen Beruf, oder im Gesundheitsbereich tätig, haben Sie die Möglichkeit, die elektronische Ausgabe dieser Zeitschrift kostenlos zu beziehen.

Die Lieferung umfasst 4–6 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Das e-Journal steht als PDF-Datei (ca. 5–10 MB) zur Verfügung und ist auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

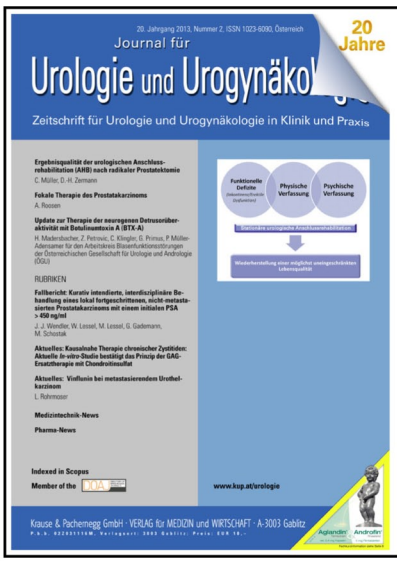
☑ **Bestellung kostenloses e-Journal-Abo**

Besuchen Sie unsere **zeitschriftenübergreifende Datenbank** mit zahlreichen Artikeln, Fallberichten und Abbildungen – teilweise durch Videoclips unterstützt!

☑ **Bilddatenbank** ☑ **Artikeldatenbank** ☑ **Fallberichte**

Krause & Pachernegg GmbH · VERLAG für MEDIZIN und WIRTSCHAFT · A-3003 Gablitz

Wir stellen vor:



Journal für

Urologie und Urogynäkologie

Zeitschrift für Urologie und Urogynäkologie in Klinik und Praxis

20 Jahre Journal für Urologie und Urogynäkologie

Herausgeber: Univ.-Prof. Dr. Franz Fischl

Homepage: http://www.kup.at/urologie