

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ
АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи



Гасанов Натиг Гасан Оглы

**Персонификация методов хирургического получения сперматозоидов у
пациентов с азооспермией в программах вспомогательных репродуктивных
технологий**

3.1.13. Урология и андрология

Диссертация

на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор,

академик РАН

Лоран Олег Борисович

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР И АНАЛИЗ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ	12
1.1 Предиктивные факторы успешного хирургического получения сперматозоидов	12
1.2 Эффективность разных способов хирургического получения сперматозоидов	23
1.3 Неoadьювантное лечение с целью повышения результативности процедур хирургического получения сперматозоидов	30
1.4 Эффективность применения программ вспомогательных репродуктивных технологий с использованием тестикулярных и эпидидимальных сперматозоидов.....	35
1.5 Влияние криоконсервации тестикулярных и эпидидимальных сперматозоидов на репродуктивные исходы ICSI	38
1.6 Перспективные технологии для оказания помощи парам с мужским фактором бесплодия и НОА.....	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	43
2.1 Общая характеристика пациентов.....	43
2.2 Техника выполнения биопсии яичка	47
2.3 Оценка репродуктивных исходов	53
2.4 Выявление предикторов успешного репродуктивного исхода.....	53
2.5 Оценка гистологических результатов.....	55
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	57
3.1 Частота успеха хирургических методов получения сперматозоидов у пациентов с азооспермией	57
3.2 Частота рождения детей после ICSI с использованием сперматозоидов, полученных хирургическим путём у пациентов с азооспермией.....	65

3.3 Результаты гистологического исследования ткани яичка у пациентов с необструктивной азооспермией	68
3.4 Результаты microTESE при феномене изолированного повышения уровня ФСГ	71
3.5 Анализ причин неверного определения разновидности азооспермии до выполнения биопсии яичка	72
3.6 Сравнительная оценка качества тестикулярных и эпидидимальных сперматозоидов у пациентов с обструктивной азооспермией.....	75
3.7 Анализ генетических причин бесплодия у пациентов с азооспермией	76
3.8 Оценка влияния варикоцеле на репродуктивные исходы в парах с азооспермией.....	79
3.9 Анализ эффективности повторных биопсий яичка	81
3.10 Осложнения биопсии яичка.....	83
3.11 Клинический пример.....	85
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	90
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	101
ВЫВОДЫ	105
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	108
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	112

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Биопсия яичка на протяжении многих лет является краеугольным камнем диагностики и преодоления тяжёлых форм мужского бесплодия [45]. Появление методики интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов (ICSI) улучшило исходы применения вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) у мужчин с необструктивной азооспермией (НОА). Одной из проблем, которую необходимо решить при ведении пациентов, нуждающихся в тестикулярной экстракции сперматозоидов (ТЕСЕ), является прогнозирование благоприятного исхода биопсии. В качестве маркеров успешности ТЕСЕ рассматривались уровни гонадотропинов, ингибина В в крови, данные ультразвукового исследования яичек и гистологическая картина паренхимы яичка [19,49]. Ни один из предикторов не является абсолютно достоверным. Нередко сперматозоиды удаётся обнаружить даже при сочетании нескольких неблагоприятных предиктивных факторов, что связано с выраженной неоднородностью тестикулярной ткани у мужчин с НОА. Долгое время самым точным предиктивным фактором в отношении возможности получения сперматозоидов считалась гистологическая картина. Однако, с появлением микродиссекционной ТЕСЕ (microТЕСЕ) это направление исследований стало менее популярным, так как данная методика существенно превосходит по эффективности стандартную ТЕСЕ и мультифокальную ТЕСЕ, позволяя выявить единичные очаги сперматогенеза даже при крайне неблагоприятном гистологическом заключении первичной биопсии [3, 64, 67, 72, 86].

Учитывая особенности подготовки супруги, необходимость проведения крайне сложной и дорогостоящей ее подготовки, вопрос о вероятности получения сперматозоидов при НОА в клинической практике остаётся крайне важным. Тем более что появляются исследования, результаты которых подвергают сомнению

существенное превосходство microTESE перед TESE [48, 58]. Это делает актуальным поиск предикторов исхода разных видов биопсии яичка и углубленное изучение преимуществ и недостатков вариантов забора сперматозоидов при ОА и НОА.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время в лечении бесплодных мужчин с азооспермией применяют вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) с хирургическим забором сперматозоидов. Определение наличия сперматозоидов у пациентов с азооспермией возможно лишь при хирургическом вмешательстве, которые выполняются для забора сперматозоидов. К сожалению, стандартное диагностическое обследование пациентов, а именно, параметры фолликулостимулирующего гормона, уровня ингибина В и объема яичек не позволяют достоверно прогнозировать исход попытки получения сперматозоидов, но комбинация этих параметров может определить вероятность успеха биопсии яичка у пациентов с азооспермией.

Выполняемое исследование призвано определить эффективность различных методов хирургического получения сперматозоидов при азооспермии, в частности по частоте получения сперматозоидов (ЧПС) и частоте рождения детей (ЧРД).

Цель исследования

Оптимизировать результаты хирургического получения сперматозоидов и репродуктивные исходы в парах с азооспермией.

Задачи исследования

1. Выполнить анализ факторов, позволяющих прогнозировать результат хирургического получения сперматозоидов у мужчин с азооспермией.

2. Оценить эффективность различных методов хирургического получения сперматозоидов при азооспермии по частоте получения сперматозоидов (ЧПС) и частоте рождения детей (ЧРД).
3. Оценить безопасность и частоту развития осложнений после попыток хирургического получения сперматозоидов разными методами.
4. Определить показания к различным видам биопсии яичка исходя из частоты получения сперматозоидов в разных клинических ситуациях.
5. Установить эффективность повторных биопсий яичка у пациентов после неудачных попыток хирургического получения сперматозоидов при необструктивной азооспермии.

Научная новизна

1. Подтверждено отсутствие сильной линейной зависимости между эффективностью методов хирургического получения сперматозоидов и эндокринными параметрами.
2. Впервые продемонстрированы неблагоприятные репродуктивные исходы у пациентов с азооспермией на фоне умеренного изолированного повышения уровня фолликулостимулирующего гормона.
3. Доказано отсутствие влияния андрологических факторов на частоту рождения детей при азооспермии в тех случаях, когда удаётся получить в достаточном количестве сперматозоиды приемлемого качества.
4. Научно подтверждена и обоснована безопасность открытых микрохирургических методов биопсии яичек и придатков яичек.
5. Впервые продемонстрировано наличие шансов на успешное получение сперматозоидов при повторной открытой микродиссекционной биопсии яичка при сертоликлеточном синдроме по данным первичного гистологического заключения.

Личный вклад автора

Автору принадлежит главная роль в определении тематики и методологии исследования, формулировке его цели и задач, сборе и статистической обработке клинического материала, интерпретации полученных результатов. Автор лично участвовал в процедурах хирургического получения сперматозоидов, а также осуществлял наблюдение за пациентами в послеоперационном периоде.

Теоретическая и практическая значимость работы

1. Определены наиболее значимые факторы, на которые можно ориентироваться для прогнозирования вероятности успешного хирургического получения сперматозоидов, что позволит точнее информировать пациента о его репродуктивном прогнозе.
2. Установлены и подробно описаны репродуктивные исходы после применения различных вариантов для хирургического получения сперматозоидов.
3. Определены основные виды осложнений биопсии яичка, что позволит минимизировать риск нежелательных явлений.
4. Продемонстрировано, что в ряде клинических случаев варикоцелэктомия улучшает репродуктивные исходы в парах с азооспермией за счёт снижения количества необходимых циклов ICSI, исходя из чего можно рекомендовать это вмешательство в рамках подготовки мужчины к биопсии яичка.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в практическую работу отделения андрологии и урологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» МЗ РФ.

Методология и методы исследования

Представленная на защиту научно-исследовательская работа выполнена с соблюдением этических норм и принципов доказательной медицины. Методология диссертационной работы предусматривала разработку дизайна исследования, определение объема выборки для обеспечения ее репрезентативности, подбор математических и программных средств статистической обработки полученных данных. Для проведения исследовательской работы использованы современные диагностические методы обследования пациентов.

Положения, выносимые на защиту

1. Клинико-лабораторные параметры, в том числе уровни фолликулостимулирующего гормона, ингибина В и объём яичек по отдельности не позволяют достоверно прогнозировать исход попытки получения сперматозоидов, но их сочетания позволяют выделить категории пациентов с разной вероятностью успеха биопсии яичка.
2. Методы биопсии яичка обладают высокой и средней эффективностью в плане ЧПС у пациентов с ОА и НОА соответственно; при условии успешного получения сперматозоидов ЧРД существенно не зависит ни от одного андрологического фактора, включая использованный метод биопсии.
3. Открытая микродиссекционная биопсия яичек и их придатка является безопасной процедурой с минимальным профилем ранних и поздних осложнений.
4. Предпочтительным методом получения сперматозоидов при НОА является microTESE; при ОА у пациентов с различной этиологией наилучшие результаты обеспечивает MESA, тогда как при ОА у других категорий пациентов допустимы пункционные методы биопсии.

5. После неудачных попыток хирургического получения сперматозоидов допустимы повторные попытки микрохирургической биопсии яичка после соответствующей подготовки пациента с учётом данных гистологического исследования.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.1.13. Урология и андрология. В соответствии с областью исследования и темой диссертации, охватывающей проблемы мужского бесплодия, в диссертационном исследовании детализированы основные положения, позволяющие оценить эффективность различных методов хирургического получения сперматозоидов при азооспермии по частоте получения сперматозоидов (ЧПС) и частоте рождения детей (ЧРД).

Степень достоверности и апробация работы

Применение современных методов статистической обработки данных дают основание считать полученные в ходе исследования результаты и сформулированные на их основании выводы обоснованными. Высокая степень достоверности и обоснованности полученных выводов, основных научных положений диссертации достигнута оценкой большого объема клинического материала включающая в себя 754 пациента. Степень достоверности полученных результатов исследований определяется достаточным объемом выборок исследований и использованием новейших методов обследования. Научные положения, выводы и рекомендации, подкреплены убедительными фактическими данными, наглядно представленным в приведённых таблицах.

Материалы и основные положения диссертации доложены и обсуждены на следующих научно-практических конференциях:

XXVIII международная конференция РАРЧ "Репродуктивные технологии сегодня и завтра" (г. Уфа, 2018);

V Конгресс Ассоциация Молодых Урологов России «Будущее урологии» (15-16 ноября 2018 года, г. Москва);

XXIX международная конференция РАРЧ "Репродуктивные технологии сегодня и завтра" (04-07 сентября 2019 года, Ростов-на-Дону)

Международная конференция «Фундаментальная и практическая андрология» (7-11 сентября 2019 года, г. Таллин, Эстония)

XIX Конгресс Российского Общества Урологов (19-21 сентября 2019 года, г. Ростов-на-Дону)

XX Юбилейный Всероссийский научно-образовательный форум "Мать и Дитя - 2019" (25-27 сентября 2019 г, г. Москва)

XIV Международный конгресс по репродуктивной медицине (21–24 января 2020 года, г. Москва).

Межклиническая научная конференция ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова (21 мая 2021 года, г. Москва).

II Евразийский конгресс урологов (16-18 марта 2023 г, г. УФА).

Заседание апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова (5 июня 2023 года, г. Москва).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, отражающие основные результаты диссертации, из них 3 статьи в журналах, включенных в международную базу цитирования Scopus и 5 статей, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/Перечень ВАК при Минобрнауки России.

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, библиографического списка, содержащего 44 отечественных и 178 иностранных источников. Диссертация иллюстрирована 12 рисунками, 13 таблицами.

ГЛАВА 1. ОБЗОР И АНАЛИЗ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1.1 Предикивные факторы успешного хирургического получения сперматозоидов

Азооспермия, под которой понимают полное отсутствие сперматозоидов в эякуляте независимо от этиологии, встречается примерно у 1% мужчин в общей популяции и у 10%-15% мужчин из бесплодных пар [53, 80]. Примерно у двух третей этих пациентов азооспермия ассоциирована с не поддающимися лечению состояниями, приводящими к сперматогенной недостаточности и самым тяжёлым формам мужского бесплодия [88].

Основной задачей уролога-андролога в ведении пациента с азооспермией, стремящегося к биологическому отцовству, является хирургическое получение сперматозоидов для последующей ICSI. В практическом плане важно определять вероятность успешного хирургического получения сперматозоидов, чтобы учитывать её при консультировании супружеской пары и благодаря этому формировать адекватные ожидания у пациентов [1, 35, 156, 194]. Неудачная TESE в день забора яйцеклеток в рамках ЭКО/ICSI оказывает негативное финансовое и эмоциональное влияние на супружескую пару [89]. В качестве возможных индикаторов успеха TESE изучались уровни гормонов, результаты ультразвукографии яичек и гистологическая структура тестикулярной паренхимы [101].

Принято считать, что частота успеха биопсии яичка при ОА приближается к 100%, тогда как у пациентов с НОА определить репродуктивный прогноз бывает крайне трудно. У большинства пациентов по клиническим характеристикам достаточно просто отличить ОА и НОА, ориентируясь на анамнез, данные осмотра, гормональные параметры и анализ эякулята; совместно эти факторы обеспечивают более чем 90%-ную точность определения формы азооспермии [81]. Эти состояния

очень важно дифференцировать друг с другом из-за различного репродуктивного прогноза, так как при ОА сперматогенез, как правило, не нарушен, а реконструктивные операции или ВРТ обеспечивают очень хорошие результаты [87]. НОА, с другой стороны, часто связана с заболеваниями и синдромами, которые на сегодняшний день считаются не поддающимися лечению.

Варианты этиологии НОА включают в себя влияние генетических факторов (микроделеции AZF-региона Y-хромосомы, синдром Кляйнфельтера), врождённые аномалии (крипторхизм), последствия перенесённых инфекций (вирусный орхит при эпидемическом паротите), воздействие гонадотоксинов (облучение, химиотерапия), травмы мошонки. Возможность терапевтического воздействия на данные факторы крайне мала. В связи с этим, тактика ведения этих пациентов обычно включает в себя какую-либо модификацию биопсии яичка и, в случае успеха, использование методов ВРТ. Стоит отметить, что этиология НОА не служит предиктором успешного репродуктивного исхода [16,25,31,210]. Единственным исключением из этого правила являются мутации AZF-локуса Y-хромосомы, которые будут обсуждаться далее. В одном из исследований было показано, что ЧПС при крипторхизме в анамнезе составила 63.1%, при химиотерапии или лучевой терапии в анамнезе – 50.0%, а при идиопатической азооспермии – 52.4%, т.е. этиология ощутимо не влияла на успех биопсии яичка [86]. У мужчин, перенесших вирусный орхит, и мужчин с синдромом Кляйнфельтера этот показатель тоже колеблется в диапазоне от 25% до 70% [84, 175].

Семенные каналцы яичек у мужчин с НОА могут иметь разные варианты дефектного сперматогенеза, которые гистологически могут определяться как гипосперматогенез, тубулярный склероз, сертоликлеточный синдром (СКС) и арест созревания (АС) [74, 129, 135]. Некоторые авторы выделяют склерогиалиноз как отдельный гистологический паттерн, характерный для НОА [91]. При этом в плане репродуктивного прогноза склерогиалиноз признаётся даже более тяжёлым гистологическим вариантом тестикулярной ткани, чем СКС. Чтобы обнаружить

единичные очаги сперматогенеза в паренхиме яичка у этих пациентов может потребоваться процедура microTESE [110]. Первая попытка хирургического получения сперматозоидов, даже если она была неудачной, имеет свою ценность, так как полученный материал может быть отправлен на гистологическое исследование. В свою очередь, полученное гистологическое заключение позволит более точно сформулировать репродуктивный прогноз, что немаловажно при ведении пациентов с НОА [89, 118, 188, 189].

У пациентов с НОА выше риск наличия хромосомных аномалий, чем средний в общей популяции [7, 24, 156]. Генетические альтерации и аномальный кариотип считаются прогностическими факторами, влияющими на успешность попыток получения сперматозоидов. Например, сообщается о неплохой вероятности успеха TESE у пациентов с синдромом Кляйнфельтера [175]. Немозаичный синдром Кляйнфельтера характеризуется одной из самых тяжёлых форм НОА [99, 207]. Малый объём яичек, выраженный склерогиалиноз и единичные участки сохранных канальцев делают желательным применение оптического увеличения при попытке хирургического получения сперматозоидов у этих пациентов. ЧПС при синдроме Кляйнфельтера существенно зависит от возраста, так как при нём в яичках с каждым годом усугубляется склерогиалиноз и ухудшается сперматогенез [155, 171]. Команда из Weill Cornell Medical College сообщает об опыте выполнения 91 процедуры microTESE у 68 мужчин с немозаичным синдромом Кляйнфельтера с ЧПС, равной 68% [166].

Кроме того, другими возможными предикторами успешной или неуспешной TESE являются сывороточные уровни фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ) и ингибина В, а также размер яичек [45]. Именно ФСГ и объём яичек являются наиболее часто обсуждаемыми предикторами. Повышенный уровень ФСГ и малый объём яичек являются признаками тестикулярной недостаточности. Была продемонстрирована отрицательная корреляция между уровнем ФСГ и количеством сперматогоний [116]. Несмотря на то, что эта обратная пропорция воспринимается многими практикующими

андрологами как трюизм, современные исследования не демонстрируют чёткой связи между ФСГ и активностью сперматогенеза. Verza и Esteves оценили предикторы успешного получения сперматозоидов у 60 пациентов с НОА; анализ кривой рабочей характеристики приёмника (ROC-анализ) показал, что площадь под кривой (AUC) для ФСГ, тестостерона и объёма яичек составляет всего лишь 0.53, 0.59 и 0.52 соответственно, что отражает очень низкий прогностический потенциал этих параметров [209]. Это справедливо и для более нового маркера – ингибина В [189]. В исследовании Ziaee et al. уровень ингибина В характеризуется значительно меньшей чувствительностью по сравнению с уровнем ФСГ и объёмом яичек в отношении вероятности обнаружения сперматозоидов при НОА [222]. Важно понимать, что подъём уровня гонадотропинов у мужчин с нарушением функций яичек является не патогенетическим фактором, а одним из звеньев компенсаторного механизма. Почти у трети пациентов с дефектами сперматогенеза был обнаружен нормальный уровень ФСГ [102]. И наоборот, даже при очень высокой концентрации ФСГ есть вероятность обнаружения подвижных сперматозоидов [179]. В работе Güneri et al. у двух пациентов с выраженным гипергонадотропным гипогонадизмом (ФСГ 41.6 и 60 мЕд/мл) удалось получить сперматозоиды при стандартной TESE [102]. Schwarzer et al. ещё в 2003 году провели крупное исследование с участием 414 пациентов с НОА, распределённых на группы по уровню ФСГ (0–10, 10–20, 21–30, 31–40 и 40 мЕд/мл), и не обнаружили никаких статистически значимых тенденций [179]. А.В. Куренков и С.Н. Куликов не нашли связи между повышением уровня ФСГ и снижением эффективности microTESE; более того, эти авторы предварительно выдвинули гипотезу о наличии обратной зависимости [17]. В исследовании Güneri et al. была выявлена следующая закономерность: как и ожидалось, максимальная ЧПС была обнаружена у пациентов с концентрацией ФСГ до 10 мЕд/мл, но при уровне ФСГ выше 30 мЕд/мл ЧПС была лучше, чем у пациентов со «средними» значениями ФСГ [102]. С одной стороны, это подчёркивает неоднозначность использования гонадотропинов как маркеров успеха TESE, а с другой, наводит на мысли о

возможной положительной компенсаторной роли сверхпороговой концентрации ФСГ. Guler et al. показали, что в их выборке высокий уровень ФСГ был отрицательным предиктором успешного получения сперматозоидов только при АС, но не при других вариантах гистологической картины тестикулярной паренхимы [101]. Торопов и соавт. сообщали, что предикторами ЧПС являются только ЛГ и ФСГ, а остальные эндокринологические показатели, включая уровень тестостерона, эстрадиола и пролактина, существенного значения не имеют [37,39].

Повышенный уровень ФСГ является типичной лабораторной находкой при НОА и встречается при любом гистологическом паттерне [220]. Дефект сперматогенеза и уменьшение числа герминогенных клеток у пациентов с НОА приводят к гиперактивации гипоталамо-гипофизарной оси в соответствии с принципами обратной связи. В исследованиях Aydin et al. и Salehi et al. наибольшие уровни ФСГ и ЛГ наблюдались у пациентов с СКС, несколько меньше – при АС, а минимальное повышение уровней гонадотропинов отмечалось при гипосперматогенезе [52, 173]. Присутствие в первичном препарате зрелых сперматид было определено как лучший маркер наличия в яичке зрелых сперматозоидов [189].

Bromage et al. также выявили значимую корреляцию между повышенным уровнем ФСГ и низкой вероятностью получения сперматозоидов с помощью случайной TESE [61]. Tsujimura et al. продемонстрировали, что дополнительными значимыми предикторами успеха microTESE являются уровень тестостерона и ингибина В [199]. Однако, Tunc et al. не нашли значимой разницы по сывороточному уровню ФСГ и ингибина В между группами пациентов, у которых TESE оказалась успешной или безуспешной [200]. В ряде исследований вообще не подтверждается возможная роль биохимических маркеров (ЛГ, ФСГ, ингибин В) в определении репродуктивного прогноза у мужчин с НОА [45, 91, 100]. Mitchell et al. проанализировали клинические данные 120 пациентов с азооспермией при нормальном уровне ФСГ; ЧПС в их выборке составила 81.7% [139]. Эти авторы предложили, что при нормальном уровне ФСГ значимым предиктором получения

сперматозоидов может стать уровень ингибина В. Они установили пороговое значение 123.5 пг/мл для этого параметра, но чувствительность и специфичность созданной модели оказались не такими уж высокими (69.7% и 66.7% соответственно).

Молекулярно-генетическая диагностика и типирование микроделеций Y-хромосомы полезны не только для определения этиологии НОА, но и для прогнозирования вероятности успеха хирургической экстракции сперматозоидов [43, 105, 121, 122]. Микроделеция похожа на хромосомную делецию тем, что при ней повреждается несколько соседних генов, но объём поражения при ней меньше и выявить её с помощью стандартных цитогенетических методов, таких как кариотипирование, нельзя [20, 141, 142]. Длинное плечо Y-хромосомы содержит регион Yq11, в котором находятся 26 генов, участвующих в регуляции сперматогенеза [41, 105, 124, 144]. Этот регион называют «фактором азооспермии» (AZF) из-за того, что микроделеции в нём часто приводят к НОА. Молекулярно-биологическая диагностика позволяет распознать микроделеции в трёх субрегионах, которые обозначаются как AZFa, AZFb и AZFc, в каждом из которых находится ген-кандидат [124]. Самым частым видом делеций AZF у мужчин с НОА являются микроделеции AZFc (около 80%), далее следуют AZFb (1%–5%), AZFa (0.5%–4%) и AZFbc (1%–3%) [42, 105, 124]. Делеции в этих субрегионах приводят к разным типам нарушения сперматогенеза. Существуют указания на казуистические случаи успешной TESE и даже рождения ребёнка после ICSI с использованием материала от мужчины с редкой формой мутации AZFa (изолированная микроделеция DDX3Y) [98]. Полные делеции в субрегионе AZFa ассоциированы с гистологическим фенотипом тотального СКС без зон остаточного сперматогенеза. Несмотря на то, что были описаны частичные делеции AZFa, которые могут сопровождаться остаточным сперматогенезом, это явление встречается чрезвычайно редко и в большинстве случаев связано с ложноположительным результатом анализа из-за мононуклеотидного полиморфизма [203, 217]. Поэтому, с практической точки зрения, обнаружение

микроделеций в субрегионе AZFa подразумевает отсутствие шансов получения сперматозоидов хирургическим путём [122, 186, 212]. Полные делеции AZFb и AZFbc клинически похожи на делеции AZFa, так как при них ЧПС также стремится к нулю [9, 112, 122]. Самой частой гистологической находкой при делециях AZFb и AZFbc является АС, хотя в ряде случаев обнаруживается СКС [148]. Любопытно, что описано три случая делеций AZFb / AZbc, сопровождавшихся не НОА, а тяжёлой олигозооспермией [122, 131, 187]. Однако, учитывая крайнюю редкость подобного фенотипа и отсутствие общепринятого представления о биологии этих мутаций, можно утверждать, что полные делеции AZFb или AZFbc практически подразумевают отсутствие вероятности получения сперматозоидов. Пациенты с мутациями AZFc, напротив, обычно имеют остаточный сперматогенез, а ЧПС при попытках тестикулярной экстракции составляет 50%–70% [186]. У этих мужчин вероятность успеха ICSI, по всей видимости, не зависит от наличия микроделеций AZFc, при условии, что сперматозоиды удалось получить хирургическим путём [150]. Однако, некоторые исследователи наблюдали нарушение развития эмбрионов, полученных в результате процедур ICSI в подобных парах [186]. Если у такой пары родится сын, то он унаследует Y-хромосому с микроделециями AZFc от отца, а значит, тоже окажется бесплодным. Тем не менее, здесь трудно делать какие-то прогнозы, так как делеции AZFc могут подвергать риску саму целостность Y-хромосомы, что способно привести к её полной потере на одном из этапов развития эмбриона и грубым кариотипическим аномалиям. Существует риск получения кариотипа 45X или мозаицизма 45X/46XY, который может привести к невынашиванию беременности или аномалиям развития гениталий [8, 157]. В связи с этим, обязательной является консультация медицинского генетика, в ходе которой должна быть представлена информация о рисках рождения сына с бесплодием и потенциальными другими аномалиями.

Микроделеции AZF-региона являются очень ценным прогностическим фактором, так как позволяют сразу исключить пациентов, у которых любые попытки экстракции сперматозоидов являются бесперспективными на данном

уровне развития медицины [112]. Однако, они встречаются не более чем у 6-16% мужчин с НОА [60, 133, 170]. Таким образом, на практике они не так уж часто служат надёжным маркером успеха microTESE.

Генетическое обследование с определением кариотипа и делеций AZF-региона должно быть предложено всем мужчинам с НОА [10,29]. Обнаружение кариотипа 47XXY или мутаций AZF-фактора не исключает возможности получения сперматозоидов, но некоторые мужчины осознанно выбирают использование донорских сперматозоидов или усыновление, когда узнают о наличии генетических аномалий. При полных делециях в AZFa, AZFb или AZFbc попытки хирургического получения сперматозоидов обычно не рекомендуются. Однако, учитывая описанные в литературе единичные успешные случаи получения сперматозоидов даже в таких ситуациях, категорически отказывать пациентам в попытке microTESE не следует, если проведено полноценное консультирование и пациент предоставляет информированное согласие на выполнение процедуры, несмотря на крайне низкий шанс успеха. Esteves et al. выполняли microTESE пяти пациентам с делециями AZFa, не обнаружив ни одного сперматозоида; также они выполняли microTESE девяти пациентам с AZFb и в одном случае получили сперматозоиды, что позволило осуществить ICSI и привело к рождению здорового ребёнка мужского пола [81]. Независимо от выбранной тактики, понимание причины бесплодия в паре может оказать положительный психологический эффект.

В исследовании Salehi et al. продемонстрирована прямая корреляция между объёмом яичек и ЧПС при TESE [173]. В этом же исследовании сообщается об отсутствии связи между хромосомными аномалиями и гистологической картиной тестикулярной паренхимы, а также ЧПС. Авторы предполагают, что выявление грубых геномных мутаций с помощью кариотипирования недостаточно для прогнозирования успеха биопсии яичка. При подтверждении нормального кариотипа целесообразно выполнение дополнительных генетических тестов [32]. В исследовании Damian et al. значимыми факторами, определяющими успех TESE,

были объём яичек, уровень тестостерона и уровень ФСГ [71]. Те же самые три фактора оказались значимыми в работе Ravizzini et al., где изучалась microTESE [168].

В исследовании Cissen et al. представлена прогностическая модель, позволяющая определить вероятность успеха TESE [65]. С помощью этой модели было продемонстрировано, что меньший уровень ФСГ и ЛГ, а также более высокий уровень тестостерона, являются положительными прогностическими факторами. Любопытно, что ещё одним положительным прогностическим фактором оказался более старший возраст мужчины. Мутации AZFc и диагноз «идиопатическая НОА» были отрицательными прогностическими факторами в отношении успеха TESE. Интересно, что в исследовании Enatsu et al. более молодой возраст и идиопатический характер НОА тоже были отрицательными предикторами ЧПС, а значимого влияния объёма яичек, уровней ФСГ, ЛГ и тестостерона на исходы microTESE выявить не удалось [78]. Это идёт вразрез с укоренившимися представлениями о том, что эффективность ВРТ в целом выше у более молодых пар [107]. Ramasamy et al. также писали о том, что возраст не оказывает негативного влияния на ЧПС при microTESE, предположив, что у более старших мужчин более вероятно относительно благоприятная приобретённая форма НОА, чем НОА, обусловленная врождённой причиной [159]. Тем не менее, в исследовании по оценке репродуктивных исходов у пациентов с синдромом Кляйнфельтера тот же самый коллектив наблюдал тенденцию к снижению ЧПС по мере увеличения возраста мужчины [166]. В исследовании Enatsu et al. доля пациентов старше 35 лет с гипосперматогенезом и СКС составила 18% и 67% соответственно, а среди пациентов младше 35 лет – 9% и 77% соответственно [78]. Напротив, Gnassi et al. указывали, что более молодой возраст является одним из значимых факторов, указывающих на более быстрое обнаружение сперматозоидов при стандартной TESE [97]. В качестве других подобных факторов эти авторы идентифицировали меньший уровень ФСГ и более благоприятные показатели гистологического исследования и спермограммы (они выполняли TESE не только при азооспермии,

но и при тяжёлой олигозооспермии и некроспермии). Предикторами ЧПС были спермограмма и гистологическая картина.

В ходе TESE нужно получать фрагмент ткани яичка для гистологического исследования. Естественно, в этом случае бессмысленно учитывать гистологию для определения вероятности получения сперматозоидов при первой TESE, так как гораздо раньше станет понятно, была успешна процедура или нет, чем будут получены результаты гистологического исследования. Тем не менее, в случае неудачной процедуры гистология будет важным предиктором успеха повторных процедур TESE/microTESE и позволит пациенту и врачу сделать информированный выбор [178]. Данных в пользу надёжности гистологического исследования тестикулярной паренхимы при НОА достаточно много [45, 52, 62, 102, 218].

Самым частым гистологическим паттерном тестикулярной ткани при НОА в нескольких исследованиях признаётся СКС [45, 52, 146, 219]. В то же время, он считается самым неблагоприятным из всех: в исследовании Salehi et al. ЧПС при нём составила 21.6% по сравнению с 94% и 43.5% при гипосперматогенезе и АС соответственно [173]. Гистологический паттерн, выявленный при первой биопсии яичка, признаётся ценным маркером вероятности получения сперматозоидов. Многие исследования продемонстрировали такую же закономерность, при которой самым благоприятным вариантом являлся гипосперматогенез, а самым неблагоприятным – СКС [180, 214, 218]. Так, в работе Enatsu et al. ЧПС в случаях, когда при первичной биопсии был констатирован СКС, составила 19.5%, при АС – 27.5%, при гипосперматогенезе – 88.3% [78]. Тем не менее, результат гистологического исследования ткани яичка никаким образом не влияет на успех ICSI при условии, что сперматозоиды всё же были получены [45]. Hessel et al. представили простой способ цитологического исследования образца, полученного при TESE, подразумевающий определение соотношений между клетками Сертоли, сперматоцитами в пахитене и сперматозоидами, позволяющий прогнозировать исход применения ВРТ в парах с НОА у мужчины [110].

При этом биопсия яичка не позволяет полностью оценить гистологию яичка и развитие герминальных клеток. В одном из исследований треть мужчин, подвергшихся успешной биопсии яичка, не имели сперматозоидов в участке, удалённом от места первичной биопсии [201]. Ramasamy и Schlegel продемонстрировали, что при microTESE у двух из пяти мужчин после 1-2 неудачных попыток экстракции сперматозоидов всё же были обнаружены зрелые половые клетки, в количестве, достаточном для ICSI. Эти же авторы указали, что даже после 3-4 биопсий с гистологическими признаками СКС у одного из девяти мужчин удалось обнаружить сперматозоиды [164]. Эти наблюдения подтверждают фокальный характер сперматогенеза при НОА и ограниченную роль гистологического исследования в формировании репродуктивного прогноза.

Боровец и соавт. построили две прогностические модели для определения состояния герминогенного эпителия до биопсии и установили, что независимыми значимыми предикторами в них являются возраст пациента, уровень ФСГ и наличие микроделеций AZFc-региона [3]. Этот же коллектив авторов представил возможности прогнозирования результатов TESE с помощью искусственной нейронной сети [38].

В исследовании Bonarriga et al. частота получения сперматозоидов при НОА составила 36%, а ОА – 100%. Была установлена корреляция между неудачей попытки экстракции сперматозоидов и повышением уровня ФСГ и низким уровнем ингибина В. В качестве пороговых значений авторы указали концентрацию ингибина В 67 пг/мл и уровень ФСГ 12.2 мЕД/мл. Ни в одном случае при наличии микроделеций Y-хромосомы в регионах AZFa и AZFb сперматозоиды не были обнаружены. Частота получения сперматозоидов при наличии мутации CFTR составила 100%. При гистологической картине гипосперматогенеза ЧПС была максимальной, за ней следовал арест созревания, а при СКС сперматозоиды удавалось получить реже всего. Сперматозоиды были успешно получены у всех пациентов с криптозооспермией. Наблюдалась тенденция к более высокой ЧПС у пациентов с более крупными яичками, но данная находка не имела статистической

значимости [58]. Авторами был сделан вывод, что единственным предиктивным фактором, исключающим возможность обнаружения сперматозоидов при биопсии яичка, являются микроделеции регионов AZFa и AZFb.

Возможным внешним фактором, влияющим на ЧПС при microTESE, является кривая обучения. Исследование Ishikawa et al. показало, что ЧПС последовательно повышалась при накоплении хирургического опыта 150 процедур microTESE [117]. С другой стороны, Enatsu et al. не выявили зависимости ЧПС от кривой обучения в своей серии из 329 пациентов [78].

Одними из немногих, кто изучал ультразвуковую картину тестикулярной паренхимы как предиктор обнаружения сперматозоидов, были Nariyoshi et al. [141] Эти авторы сообщили, что при ультразвуковой толщине семенных канальцев более 300 мкм вероятность успеха microTESE составила 61%, а у остальных пациентов – лишь 9%.

1.2 Эффективность разных способов хирургического получения сперматозоидов

Основным показанием к биопсии яичка является бесплодный брак, в котором у мужчины подтверждена азооспермия. Хирургические процедуры позволяют получить сперматозоиды для немедленной ICSI или криоконсервации, а также, в случае TESE или microTESE, выполнить гистологическое исследование образца тестикулярной паренхимы.

Дооперационное обследование должно включать пальпацию гениталий, ультрасонографию органов мошонки и лабораторные анализы, включая определение гормонального профиля. Как и перед любой хирургической процедурой, обязательно получение информированного согласия пациента в документальной форме.

Для получения сперматозоидов применяются различные хирургические методы. В самом начале развития этого направления репродуктологии считалось, что тонкоигольная тестикулярная аспирация является эффективным и нетравматичным (по сравнению с TESE) способом получения материала из яичка, в том числе и при НОА [130]. Однако, контролируемые исследования на животных показали, что тонкоигольная аспирация при своей кажущейся минимальной травматичности может приводить к прогрессирующему и необратимому повреждению семенных канальцев с изменением их архитектоники по ходу движения иглы, где остаются только клетки Сертоли, фокусы хронического воспаления и некроз. При TESE подобные изменения наблюдаются только локально в зоне выполнения биопсии, а окружающая ткань остаётся интактной [184].

Микродиссекционная TESE в комбинации с ICSI в некоторых источниках указывается как процедура первой линии у мужчин с НОА [21, 78]. На самом деле, несмотря на кажущуюся травматичность, *microTESE*, которая выполняется с прямой визуализацией семенных канальцев под операционным микроскопом, успешного получения сперматозоидов по сравнению с другими процедурами. Однако, ЧПС даже при *microTESE* далека от абсолютной и находится в диапазоне 20-60% [118, 151, 165]. Это позволяет минимизировать повреждение ткани яичка и повышает вероятность нахождения сперматозоидов [199]. Кроме того, реальное превосходство *microTESE* перед стандартной TESE пока неясно, так как последние исследования не подтвердили её преимуществ перед другими видами получения сперматозоидов в отдельных клинических сценариях [55,73]. Другие авторы подвергают сомнению качество и жизнеспособность сперматозоидов, полученных при *microTESE*, в сравнении с теми, которые получены при обычной TESE [91, 132]. Есть мнение, что *microTESE* даёт лучшие результаты при наличии отдельных «островков» сперматогенеза в тестикулярной паренхиме на фоне СКС, но у пациентов с более однородными гистологическими паттернами (например, с арестом созревания) эта процедура представляется менее целесообразной [73].

Систематический обзор и мета-анализ Bernie et al., включающий данные 1890 пациентов, показал, что при прямом сравнении ЧПС при microTESE была в 1.5 раза выше (95%-ный доверительный интервал: 1.4–1.6), чем при стандартной TESE [55]. Общим слабым моментом для всех исследований, вошедших в этот мета-анализ, является отсутствие адекватных сопоставимых контрольных групп. Ещё одной причиной для осторожности в интерпретации результатов подобных исследований является естественная вариабельность процессов сперматогенеза: даже у человека с нормозооспермией показатели спермограммы могут серьёзно измениться всего за несколько дней, а значит, вероятно, частота успеха или неудачи хирургического получения сперматозоидов тоже может существенно варьировать.

Во многих исследованиях демонстрируется более высокая ЧПС при использовании microTESE по сравнению со стандартной TESE [173]. В настоящее время наблюдается тенденция к более широкому применению microTESE из-за низкой частоты осложнений и более высокой ЧПС. Автор методики (Schlegel) сообщал, что ЧПС при стандартной TESE в его выборке составляла 45% по сравнению с ЧПС 63% при microTESE [177]. Для сравнения, по литературным данным эффективность одиночной TESE находится в диапазоне 41.6–49.5%, мультифокальной TESE – 52.5–56%, microTESE – 35–77% [22, 61, 66, 67, 75, 77, 84, 86, 93, 168, 153, 188]. Вероятно, что не во всех исследованиях microTESE эта процедура была реально необходимой и часть пациентов могла бы успешно реализовать свой репродуктивный потенциал и при использовании более щадящей методики хирургического получения сперматозоидов. Действительно, в исследованиях, посвящённых microTESE, эта процедура предлагалась всем пациентам, даже пациентам с хорошим прогнозом. Например, в них фигурируют мужчины с гистологической картиной гипосперматогенеза в тестикулярной паренхиме, хотя хорошо известно, что ЧПС в таких случаях достаточно высока при использовании любого метода биопсии яичка [195]. Применение этой процедуры обосновано при фокальном сперматогенезе, который встречается у пациентов с НОА. Сперматозоиды при microTESE могут быть получены даже при СКС [73].

MicroTESE может выполняться в день получения яйцеклеток для немедленного использования в ICSI («fresh-биопсия»). Тем не менее, никакой из существующих методов не позволяет достоверно прогнозировать успех microTESE, поэтому желательно выполнять эту процедуру заранее и выполнять криоконсервацию полученных сперматозоидов в случае успеха. Если криоконсервированных сперматозоидов оказывается недостаточно, в день забора яйцеклеток выполняется повторная процедура.

Желателен способ повышения ЧПС при microTESE – например, гормональная терапия при НОА – но, к сожалению, пока не существует общепринятых методов, позволяющих существенным образом повысить результативность данной процедуры [12, 182]. Кроме того, как обсуждалось выше, нужен надёжный маркер, позволяющий врачу определить случаи, в которых имеет смысл выполнять microTESE.

В крупном исследовании Enatsu et al. ЧПС при microTESE составляла всего 29.5%, хотя это частично объясняется маршрутизацией пациентов в учреждении, где проводилось исследование [78]. При нормальном объёме яичек и нормальном уровне ФСГ пациентам выполнялась стандартная TESE, а после неудачных попыток и во всех остальных случаях предпринималась попытка microTESE, что могло привести к селекции пациентов с СКС в данной группе.

На ЧПС оказывает влияние глубина проводимой диссекции. Это может быть ещё одним объяснением различий в представленных литературных данных. Ramasamy et al. разделяли процедуру microTESE на два этапа, первым из которых была поверхностная экстракция семенных канальцев, а вторым – более глубокий поиск в нижележащих участках паренхимы [162]. При выполнении второго этапа ЧПС повышалась на 18.4%. С другой стороны, глубокая диссекция влечёт за собой риск более тяжёлого повреждения яичка и может затянуть операцию в то время как существуют указания на то, что длительность процедуры влияет на её успех [160].

Результат гистологического исследования при первичной биопсии может указывать на целесообразность выполнения microTESE в рамках второй попытки

[73]. СКС, при котором герминальные клетки в гистологическом препарате вообще отсутствуют, а просвет семенных канальцев выстилают только нормальные клетки Сертоли, делает предпочтительной процедуру microTESE [93, 151]. При СКС ЧПС при выполнении microTESE варьирует от 22.5% до 41% по сравнению с 6.3–29% при выполнении стандартной TESE. При АС, при котором не происходит мейоз тетраплоидных сперматозоидов с образованием гаплоидных сперматид, разницы в ЧПС при TESE и microTESE нет, хотя этот показатель очень сильно варьирует в разных работах [73]. При гипосперматогенезе, когда снижено количество герминальных клеток несмотря на наличие всех стадий сперматогенеза, только в исследовании Ramasamy et al. ЧПС была статистически значимо выше при microTESE по сравнению с TESE [161].

Доказательная база по частоте успеха salvage-процедур получения сперматозоидов у мужчин с НОА представлена лишь очень небольшим количеством ретроспективных анализов с разной методологией и разными критериями отбора пациентов. Частота успеха в этих сериях случаев варьирует от 30% до 41.6% при первой повторной попытке [104]. Yücel et al. сообщают о ЧПС 42.8% при повторной microTESE, и отмечают, что единственным фактором, указывающим на вероятность успеха процедуры, был уровень ФСГ [221]. Есть сообщение о 100%-ном успехе после шести попыток TESE, хотя только 2 пациента из 628 согласились на такое большое количество процедур [208].

В одной ретроспективной серии случаев повторная microTESE давала частоту успеха около 82% [167]. Предиктивными факторами успеха повторной попытки были меньший уровень ФСГ и больший объем яичек. Исследования в этой области являются ретроспективными, нерандомизированными и неконтролируемыми. По данным этих исследований считается, что кумулятивная ЧПС повышается по мере увеличения количества попыток и является более высокой у мужчин, у которых уже была одна успешная попытка.

Важно учитывать возможные последствия попыток хирургического получения сперматозоидов [2]. Выше было представлено сравнение TESA и TESE

по их возможной травматичности. Аналогично, спорным вопросом является травматичность и отсроченные последствия стандартной TESE и микродиссекционной TESE. Существует критическое мнение, что microTESE наносит необратимый вред паренхиме яичка из-за своей большей «инвазивности» по сравнению со стандартной TESE с забором всего одного фрагмента тестикулярной ткани. С другой стороны, указывается, что при microTESE в меньшей степени повреждаются расположенные под белочной оболочкой яичка кровеносные сосуды, в результате чего не компрометируется тестикулярный кровоток [91]. Несомненно, минимальной степенью инвазивности обладает однократная TESE с получением небольшого объема ткани. Мультифокальная TESE более инвазивна и с каждой инцизией белочной оболочки возрастает риск непреднамеренного повреждения сосудов. Расширенный экваториальный разрез при microTESE также может нанести вред яичку. В последнее время всё чаще поднимается вопрос о том, что microTESE может индуцировать или усугублять гипогонадизм из-за гибели клеток Лейдига [190, 197, 198]. Инцизии, особенно случайные, способны привести к деваскуляризации и атрофии ткани яичка. В результате, кровоизлияние и формирование рубцовой ткани может повредить как сперматогенез, так и продукцию гормонов [165]. Franco et al., пытаясь минимизировать травматичность хирургической экстракции сперматозоидов и в то же время стремясь к использованию всех шансов для повышения ЧПС при НОА, предложили «поэтапную» стратегию выполнения TESE [91]. С хирургической точки зрения, она не представляет из себя ничего нового. Эта процедура начинается со стандартной TESE из одной точки. Если сперматозоиды в полученном образце не найдены, авторы предлагают переходить к полноценной microTESE через тот же самый разрез. Если после этого шага эмбриолог тоже не обнаруживает сперматозоидов в материале, то предложено переходить к мультифокальной TESE в контралатеральном яичке. Таким образом, при неудаче каждого этапа получения сперматозоидов постепенно повышается инвазивность проводимого вмешательства. Интересно, что ЧПС на всех этапах этой процедуры в исследовании

Franco et al. была одинаковой. Marconi et al. демонстрировали похожие результаты при сравнении разных видов TESE [132].

Работа Okada et al. является одной из немногих, где представлена частота осложнений после стандартной TESE в сравнении с microTESE; у одного пациента после TESE имелись признаки раневой инфекции и ещё у одного зафиксирован гипогонадизм, вызванный ишемической атрофией яичка [151]. В нескольких исследованиях осложнения систематически оценивались с помощью ультразвукографии мошонки в послеоперационном периоде [50,151, 165]. В группах microTESE гематома через 1 и 3 месяца после операции встречалась значительно реже. Фиброз и уменьшение объёма яичка (более чем на 2 см³) через 6 месяцев также встречались реже в группе microTESE. В исследовании Okada et al. у двух пациентов отмечалось значимое снижение уровня тестостерона сыворотки крови через 6 месяцев после стандартной TESE и ни одного такого случая не было зафиксировано после microTESE, хотя эта разница не была статистически значимой [151]. Ramasamy et al. не наблюдали различий по уровню тестостерона между двумя видами TESE [165]. В исследовании Amer et al. описан ультразвукографический мониторинг в течение 6 месяцев после TESE и microTESE; после стандартной TESE чаще встречалась сегментарная деваскуляризация яичка, хотя постоянной деваскуляризации через 6 месяцев не наблюдалось ни у кого из пациентов [50]. Oliveira Filho et al. сообщали о вероятности развития альтераций сперматогенеза в противоположном яичке после microTESE, которые гистологически проявляют себя как АС [152].

Turunc et al. в качестве первого этапа выполняли только microTESE пациентам с тяжёлой НОА и атрофией яичка, в результате чего ЧПС составила примерно 20% [202]. Остальным пациентам, у которых был более благоприятный прогноз, сначала выполнялась стандартная TESE из трёх участков. Если ни в одном из них не обнаруживалось сперматозоидов, разрезы соединялись и из сформированного длинного линейного доступа проводили «вторичную»

microTESE. ЧПС при этом повышалась с 34% до 51%. Тем не менее, стандартная TESE обеспечивала большую часть успешных результатов.

Эффективность хирургического получения сперматозоидов при НОА зависит не только от уролога-андролога, непосредственно выполняющего оперативное вмешательство, но и от лабораторного персонала, который осуществляет обработку и микроскопию полученного материала [157]. Gnessi et al. показали, что возраст пациента, параметры спермограммы (тяжёлая олигозооспермия, некроспермия или полная азооспермия), показатель ФСГ и гистология влияют на время, которое требуется для поиска сперматозоидов в лабораторных условиях [97].

1.3 Неoadьювантное лечение с целью повышения результативности процедур хирургического получения сперматозоидов

Неoadьювантное лечение в контексте ОА, как правило, не имеет смысла, так как причина бесплодия является органической и может быть преодолена только хирургическим путём, хотя может назначаться антиоксидантная терапия с целью улучшения качества сперматозоидов перед ВРТ. Что касается НОА, то после получения благоприятного результата генетического анализа следующим этапом нужно определить, следует ли использовать какие-либо медикаментозные или хирургические методы лечения перед хирургическим получением сперматозоидов. Если такая возможность есть, то следует ей воспользоваться, так как почти у половины пациентов с НОА попытка ВРТ откладывается из-за неудачи получения сперматозоидов [63, 82, 126]. Тем не менее, в большинстве случаев полноценное терапевтическое воздействие на её причины, приводящее к появлению сперматозоидов в эякуляте, невозможно. Одним из самых известных исключений из этого правила является гипогонадотропный гипогонадизм, редкое эндокринное нарушение, сопровождающееся нарушением сперматогенеза из-за дефицита гонадотропинов [90]. Этих пациентов легко распознать по низкому уровню

тестостерона и чрезвычайно малой концентрации гонадотропинов (ФСГ и ЛГ) в крови, а также очень слабо выраженной вирилизации. В эту категорию входят больные с врождённым (синдром Каллмана) и приобретённым гипогонадотропным гипогонадизмом. Приобретённые формы могут развиваться у мужчин, длительно получавших заместительную терапию тестостероном, либо в результате повреждения нейроэндокринных структур центральной нервной системы, т.е. гипоталамуса и гипофиза, и при этом прогноз будет несколько хуже, чем при врождённых формах. Пациенты с гипогонадотропным гипогонадизмом получают выраженный эффект с восстановлением сперматогенеза на фоне введения препаратов экзогенных гонадотропинов или гонадотропин-рилизинг гормона. Как правило, при адекватном лечении у них появляются сперматозоиды в эякуляте, что исключает необходимость тестикулярной биопсии. В связи с этим, эта форма НОА далее обсуждаться не будет.

Считается, что эмпирическая терапия при НОА неэффективна, особенно при высоких уровнях гонадотропинов в плазме. Тем не менее, учитывая парадоксально слабую стимуляцию клеток Лейдига и Сертоли эндогенными гонадотропинами, теоретически, такая терапия может работать при определённых условиях. Пульс-секреция гонадотропинов в норме характеризуется определённой частотой, амплитудой и продолжительностью периодов секреции, но из-за высокого базального уровня ЛГ и ФСГ у большинства мужчин с НОА амплитуда их секреции снижена [181]. Более того, примерно 50% этих мужчин имеют низкий уровень общего тестостерона, а значит, вероятно, не имеют адекватного интратестикулярного содержания тестостерона, которое необходимо для регуляции процессов сперматогенеза, как и адекватная ФСГ-стимуляция клеток Сертоли [57, 169]. Описано применение при НОА таких лекарственных препаратов, как кломифена цитрат, гонадотропины и ингибиторы ароматазы [27, 126, 163].

В выборке мужчин с синдромом Кляйнфельтера Ramasamy et al. продемонстрировали, что максимально высокая ЧПС наблюдалась у пациентов с нормальным уровнем тестостерона (> 300 нг/дл), составив 86% [166]. Остальным

пациентам назначалась неoadьювантная гормональная терапия (ингибиторы ароматазы, кломифена цитрат или препараты хорионического гонадотропина человека). Разницы по ЧПС при использовании разных препаратов не было. Однако, те мужчины с синдромом Кляйнфельтера, у кого наблюдался биохимический эффект после назначения гормональной терапии, имели более высокую результативность *microTESE* по сравнению с теми, у кого терапия не влияла на уровень тестостерона (77% и 55% соответственно).

Кломифена цитрат является селективным модулятором рецепторов к эстрогенам, который конкурентно связывается с эстрогенами на рецепторах к ним в гипоталамусе и гипофизе. После начала действия кломифена гипофиз воспринимает заниженную концентрацию эстрадиола, что приводит к усилению секреции ФСГ и ЛГ. ЛГ стимулирует клетки Лейдига, в результате чего усиливается выработка тестостерона [126].

Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) является гликопротеидом, аналогичным по структуре нативному ЛГ; в отличие от последнего он обладает более высокой аффинностью и более продолжительным периодом полувыведения [128]. ХГЧ связывается с ЛГ-рецепторами на уровне клеток Лейдига и напрямую стимулирует выработку андрогенов.

Ингибиторы ароматазы блокируют соответствующий фермент, присутствующий в жировой ткани, печени, гонадах и коже, превращающий тестостерон и другие андрогенные стероиды в эстрадиол. Изменённое соотношение тестостерона и эстрадиола, которое часто наблюдается у мужчин с избыточной массой тела, может быть нормализовано с помощью перорального приёма ингибиторов ароматазы [106, 169].

В соответствии с результатами клинических исследований, эмпирическая гормональная неoadьювантная терапия при НОА не всегда позволяла активировать сперматогенез, но практически всегда в той или иной мере успешно повышала уровень эндогенного тестостерона, даже при гипергонадотропном гипогонадизме [114, 166, 167, 182, 183]. В исследовании Shinjo et al. наблюдалось пятикратное

увеличение интратестикулярного уровня тестостерона на фоне терапии ХГЧ [181]. В то же время, около половины мужчин, получающих ХГЧ, испытывают снижение уровня эндогенного ФСГ из-за отрицательной обратной связи на фоне повышения уровня тестостерона сыворотки крови [181, 183]. До конца непонятно, следует ли считать этот эффект благотворным или неблагоприятным в отношении сперматогенеза: с одной стороны, ФСГ является важнейшим регулятором этого процесса, а с другой стороны, высокий уровень ФСГ в плазме приводит к down-регуляции его рецепторов и, соответственно, ухудшению функции семенных канальцев. Одной из мишеней андроген-сигналирования являются клетки Сертоли, в которых активируются ядерные рецепторы к андрогенам, экспрессия которых у мужчин с НОА повышена по сравнению с мужчинами с нормальным сперматогенезом [59, 120]. Учитывая то, что клетки Сертоли поддерживают развитие мужских гамет, целесообразны попытки восстановления их функции путём повышения уровня эндогенного тестостерона, содержание которого обычно в 100 раз выше в яичках по сравнению с сывороткой [181]. Точный механизм предполагаемого положительного влияния гормональной терапии при НОА непонятен; предполагается, что высокий интратестикулярный уровень тестостерона стимулирует синтез ДНК сперматогоний и усиливает сперматогенез в тех случаях, когда наблюдается сохранная сперматогенная активность [23, 134, 149, 181]. Это может приводить к образованию хорошо дифференцированных семенных канальцев, которые могут быть обнаружены при попытках хирургического получения сперматозоидов. Учитывая отсутствие клинических исследований с хорошим дизайном, сделать однозначный вывод о влиянии вышеперечисленных препаратов на сперматогенез и ЧПС пока не представляется возможным.

Варикоцеле, которое встречается у некоторых пациентов с НОА, является ещё одной потенциальной мишенью для воздействия. Достоверно неизвестно, является ли оно фактором патогенеза НОА или просто инцидентальной находкой у этих мужчин. Тем не менее, и в этих клинических ситуациях выполняются попытки

хирургического лечения варикоцеле [33, 215]. Целью вмешательства при этом является либо повышение вероятности успеха попыток хирургического получения сперматозоидов, либо достижение появления сперматозоидов в эякуляте, устраняющее необходимость в хирургическом получении сперматозоидов как таковом.

В 2010 году был опубликован мета-анализ результатов одиннадцати когортных исследований с суммарным участием 233 пациентов с НОА и клиническим варикоцеле [215]. После микрохирургической варикоцелэктомии подвижные сперматозоиды в эякуляте обнаруживались у 39% мужчин со средним сроком наблюдения, составившим 13 месяцев. При этом средняя концентрация сперматозоидов составила 1.6 млн/мл, а естественного и ВРТ-ассистированного зачатия удалось добиться у 26% пар. Анализ тестикулярных биоптатов, полученных перед варикоцелэктомией или во время неё, показал, что гипосперматогенез и АС были со значительно большей вероятностью ассоциированы с появлением сперматозоидов в эякуляте, чем СКС (отношение вероятностей [ОВ]: 9.4; 95%-ный доверительный интервал [ДИ]: 3.2–27.3).

Даже с учётом вышеприведённых данных, у большинства этих мужчин сохраняется НОА несмотря на выполненную варикоцелэктомию, что требует попыток хирургического получения сперматозоидов. В одном из исследований Schlegel и Kaufmann показали, что ЧПС у мужчин после хирургического лечения варикоцеле и у мужчин с варикоцеле, которым оперативное вмешательство не выполнялось, была практически одинаковой (60%) [176]. Существуют и результаты, указывающие на обратное: Inci et al. продемонстрировали на выборке из 96 мужчин, что ЧПС была значительно выше у мужчин после хирургического лечения варикоцеле (53% против 30%, ОВ: 2.63, 95% ДИ: 1.05–6.60; $p = 0.03$) [115]. В исследовании с участием 66 мужчин Naydardedeoglu et al. сообщили, что ЧПС у мужчин после варикоцелэктомии составила 61%, а у мужчин с варикоцеле без хирургического лечения ЧПС составила лишь 38% [108].

1.4 Эффективность применения программ вспомогательных репродуктивных технологий с использованием тестикулярных и эпидидимальных сперматозоидов

Исследований, посвящённых репродуктивным исходам ICSI сперматозоидами, полученными хирургическим путём, не так много [138, 185, 204]. Оценка частоты наступления беременности и частоты рождения живого ребёнка требует более длительного наблюдения за парой. Были разработаны предиктивные модели, позволяющие прогнозировать ЧПС или исход беременности после TESE в парах, где у мужчины наблюдается НОА, но они пока не вошли в рутинную клиническую практику [136].

При этом успех ВРТ при мужском бесплодии может определять не только качество сперматозоидов, но и другие, не зависящие от мужчины, факторы. Silber et al. изучали влияние возраста женщины и её овариального резерва на результаты ВРТ при азооспермии. Они изучили данные сплошной выборки из 249 пар, в которых у мужчины была азооспермия. Им выполнялась микрохирургическая аспирация сперматозоидов из придатка (MESA) или TESE с последующей ICSI. У 186 мужчин была ОА и у 63 мужчин была НОА из-за тестикулярной недостаточности. Ни гистологическая картина в паренхиме яичка, ни источник, количество и качество сперматозоидов не повлияли на частоту фертилизации (ЧФ) и частоту наступления беременности. Возраст матери и овариальный резерв не влияли на фертилизацию, но серьёзно сказывались на имплантации эмбрионов, наступлении беременности и частоте рождения ребёнка. Женщины 20-30 лет имели ЧРД 46% на один цикл, женщины 30-36 лет – 34%, женщины 37-39 лет – 13%, и женщины старше 40 лет имели ЧРД около 4%. Количество полученных яйцеклеток тоже влияло на ЧНБ и ЧРД, но в меньшей степени, чем возраст [185]. Это может указывать на то, что именно женские факторы, как ни странно, определяют успех

ВРТ в парах с азооспермией, где удалось получить сперматозоиды хирургическим путём.

В мета-анализе Donoso et al. удалось идентифицировать только три исследования, в которых оценивалась ЧРД в парах с НОА, что не позволило авторам сделать конкретных выводов [75]. Несмотря на это, было предположено, что вид хирургического получения сперматозоидов в случае успеха не влияет на дальнейшие результаты ICSI. Nassar et al. продемонстрировали, что ЧРД после ICSI сперматозоидами, полученными при TESE, составляла 11.5% на один цикл, а при использовании сперматозоидов, полученных с помощью тонкоигольной тестикулярной биопсии – 8.2% [142].

Esteves и Agarwal утверждают, что ЧНБ после ICSI в парах с НОА ниже, чем в парах, где использовались сперматозоиды из эякулята или биоптатов при ОА. В одном из исследований они изучили 188 пар, подвергшихся ICSI с использованием сперматозоидов, полученных из яичка при НОА, и сравнили результаты с 182 парами, где у мужчины была ОА, и 465 парами, где у мужчин были сперматозоиды в эякуляте. ЧРД была значительно ниже в группе НОА (21.4%) по сравнению с группой ОА (37.5%) и группой, где применялись сперматозоиды из эякулята (32.3%). В этой выборке родилось 427 детей при 326 родах. По соответствию гестационному возрасту, недоношенности и массе тела при рождении статистически значимой разницы между группами не наблюдалось, хотя авторами отмечена тенденция к худшим неонатальным исходам в группах НОА и ОА [85]. В другом исследовании Esteves сравнивал результаты ICSI у 365 пар, мужчины в которых подверглись microTESE из-за НОА, и 40 пар, в которых применялись донорские сперматозоиды из-за неудачи получения собственных сперматозоидов хирургическим путём. Также в анализ были включены 146 пар, где у мужчин была ОА. ЧПС при НОА была значительно ниже, чем при ОА (41.4% против 100%), что было вполне предсказуемым результатом. ЧРД после ICSI была ниже в группе НОА (19.9%) по сравнению с группой, где применялись донорские сперматозоиды (37.5%; ОВ: 0.377, 95% ДИ: 0.233–0.609, $p < 0.001$), и по сравнению с группой ОА

(34.2%; ОВ: 0.403, 95% ДИ: 0.241–0.676, $p = 0.001$). Тем не менее, группы не отличались по частоте невынашивания беременности и неонатологическим показателям (соответствие гестационному возрасту, масса тела при рождении, аномалии развития, перинатальная смертность) [82].

В исследовании Ravizzini et al. изучены репродуктивные исходы 56 попыток microTESE у мужчин с НОА [168]. Сперматозоиды были получены в 32 случаях. Частота имплантации и ЧНБ после ICSI составили 20% и 40% соответственно. В 18.7% случаев зафиксирован эпизод невынашивания беременности. Среднее количество перенесённых эмбрионов типа А составило 1.9 за один цикл.

При синдроме Кляйнфельтера, когда следовало бы ожидать худшего репродуктивного результата по сравнению с другими случаями, ЧНБ и ЧРД по данным Ramasamy et al. составили 57% и 45% соответственно, что существенно не отличается от аналогичных показателей у других групп пациентов [167]. Следует отметить, что это исследование проводилось в условиях центра репродуктивной медицины Weill Cornell, ведущего медицинского учреждения, где впервые начали применять microTESE, поэтому полученные ими результаты могут не отражать ситуации в большинстве других центров.

Есть точка зрения, согласно которой в случае успешного получения сперматозоидов никакие исходные факторы со стороны мужчины не влияют на дальнейшие репродуктивные результаты ICSI [103]. Однако, достаточно большое количество работ демонстрируют, что НОА может негативно влиять на ЧНБ даже при успешном получении сперматозоидов; это может быть связано с тем, что сперматозоиды у мужчин с НОА имеют дефекты центриолей и генетического материала, что сказывается на жизнеспособности формируемого эмбриона [109, 138, 145, 153, 213]. При НОА может быть нарушена целостность ДНК сперматозоидов, несмотря на то, что у мужчин без азооспермии ДНК тестикулярных сперматозоидов зачастую является более сохранной, чем ДНК сперматозоидов эякулята [15,44]. Meseguer et al. показали, что индекс фрагментации ДНК, определённый с помощью теста дисперсии хроматина, в

тестикулярных сперматозоидах у пациентов с НОА был выше, чем при ОА (46.9% и 35.9% соответственно; $p < 0.05$). В свою очередь, фрагментация ДНК негативно сказывалась на морфологии эмбрионов ($r = -0.163$; $p = 0.01$) [9,138]. Это позволяет предположить, что тестикулярные сперматозоиды, полученные хирургическим путём у мужчин с НОА, являются функционально неполноценными. Несмотря на это, нет убедительных данных, указывающих на то, что при этом страдает здоровье потомства. Требуется постоянный мониторинг здоровья детей, рождённых в таких парах, учитывая ограниченное число анализированных случаев и отсутствие подробных сведений об их физическом и психоневрологическом развитии [54].

1.5 Влияние криоконсервации тестикулярных и эпидидимальных сперматозоидов на репродуктивные исходы ICSI

Технология ICSI произвела революцию в андрологии, так как позволяет использовать для ВРТ сперматозоиды, которые не прошли через придаток яичка. Исследования показали, что ICSI одинаково эффективна при использовании тестикулярных и эпидидимальных сперматозоидов [119, 145]. Более того, классические исследования показали, что частота успеха при ICSI свежими сперматозоидами из яичка или его придатка эквивалентна таковой при экстракорпоральном оплодотворении с использованием сперматозоидов из эякулята [30, 46, 94, 205]. ICSI сделала возможным использование криоконсервированных тестикулярных сперматозоидов, преимуществом которого является возможность выполнения процедур по получению сперматозоидов и яйцеклеток в разные дни. Возможность криоконсервации сперматозоидов перед ICSI делает подход к решению репродуктологических проблем пары более гибким и расширяет варианты оказания помощи при бесплодии. Иногда это позволяет избежать повторных хирургических вмешательств для получения гамет. Как

только стало понятно, что применение криоконсервированных сперматозоидов для ICSI приводит к допустимым показателям ЧФ и ЧНБ, методика быстро вошла в клиническую практику [127, 153]. Однако, уже тогда задавался вопрос, остающийся спорным до сих пор: обеспечивают ли свежие сперматозоиды более благоприятный результат ICSI по сравнению с криоконсервированными [196, 216]. Были опубликованы сведения о том, что криоконсервация ухудшает оплодотворяющую способность сперматозоидов [111, 193]. Wood et al. предположили, что источник сперматозоидов (яичко или придаток) влияет на вероятность сохранения их оплодотворяющей способности при заморозке и последующей разморозке [216]. В исследовании Ulug et al. эпидидимальные сперматозоиды после разморозки чаще приводили к успешной фертилизации при ICSI, чем тестикулярные [204]. Есть указания на то, что тестикулярные и эпидидимальные сперматозоиды более чувствительны к холоду, чем сперматозоиды из эякулята, хотя эти данные были получены из исследований на животных, и их нельзя экстраполировать на человека без дальнейшего подтверждения [96]. Esteves и Varghese указывают, что обычно размороженные тестикулярные сперматозоиды оказываются неподвижными [83]. Выживаемость гамет может быть повышена при заморозке в пустой zona pellucida или витрификации [79, 145]. Инкубация сперматозоидов со стимуляторами подвижности, такими как пентоксифиллин, помогает отобрать для ICSI жизнеспособные сперматозоиды [123]. Несмотря на это, пациентов следует предупреждать, что результаты ICSI ухудшаются при использовании только неподвижных сперматозоидов после криоконсервации.

В упомянутом выше исследовании Ulug et al. при ICSI у пар использовались как свежие, так и криоконсервированные сперматозоиды, что позволяло напрямую сравнить их оплодотворяющую способность между собой [204]. Разницы по ЧФ и ЧНБ обнаружено не было. Тем не менее, в этом исследовании нельзя исключить влияние эффекта оптимизации цикла при повторных попытках применения ВРТ.

Повреждение сперматозоида может произойти на любом этапе криоконсервации: при заморозке, разморозке, добавлении и удалении криопротектора, в качестве которого может применяться глицерин [48]. Микроскопические исследования показали, что заморозка сперматозоида иногда приводит к разрыву внутренней и внешней акросомальной и клеточной мембран из-за формирования кристаллической решётки льда, что делает их использование для ICSI невозможным [147]. Более того, при заморозке-разморозке интенсифицируется производство свободных радикалов и активных форм кислорода, что приводит к вторичному повреждению клеток из-за пероксидации липидов плазматической мембраны [64]. Verheyen et al. показали, что после криоконсервации увеличивается доля сперматозоидов с дефектами шейки и это может негативно повлиять на ЧФ [206].

Влияние криоконсервации сперматозоидов на репродуктивные исходы лучше всего оценивать по парам, которые подвергаются первому циклу ICSI. В некоторых работах оценивались результаты независимо от того, какая по счёту попытка применения ВРТ была у пары [26, 203]. Это не совсем корректно, так как результаты второго и последующего циклов ICSI могут быть завышены из-за того, что происходит оптимизация стимуляции женщины, которая может в большей степени влиять на исходы, чем мужские факторы. В исследовании Kalsi et al. участвовала большая выборка пар, подвергающихся первому циклу ICSI с использованием свежих или криоконсервированных сперматозоидов, полученных хирургическим путём [119]. Они указали, что криоконсервация не оказывает существенного отрицательного влияния на результат первой попытки ICSI независимо от источника сперматозоидов. Напротив, при применении криоконсервированных сперматозоидов ЧФ и ЧНБ были выше, чем при использовании свежих образцов, что противоречит данным других исследований [72, 154]. Это может объясняться тем, что для криоконсервации в исследовании Kalsi et al. брали только сперматозоиды с наилучшими характеристиками, чтобы максимизировать вероятность сохранения их функции после заморозки-

оттаивания. Мета-анализ десяти исследований, в которых суммарно изучено 734 цикла ICSI, показал, что при использовании криоконсервированных сперматозоидов частота имплантации была ниже по сравнению со свежими (отношение рисков: 1.75; 95% ДИ: 1.10–2.80) [68].

Криоконсервация негативно сказывается на морфологии любых сперматозоидов, так как образование льда внутри клетки приводит к разрыву плазматической мембраны [140, 148, 205]. В результате свободные радикалы получают прямой доступ к ядру сперматозоида и могут повреждать его ДНК [70]. Цитоплазма тестикулярных сперматозоидов обычно имеет очень слабые механизмы антиоксидантной защиты и не оказывает протективного действия в этой ситуации [49]. По сравнению с эпидидимальными сперматозоидами они более уязвимы, так как упаковка хроматина в них ещё не завершена до тех пор, пока не произойдёт окисление сульфидных групп при транзите через придаток яичка. Длительная инкубация после оттаивания ещё более усугубляет повреждение ДНК ядра, снижая качество сперматозоидов для ICSI [69]. Тем не менее, несмотря на всё это, в нескольких клинических исследованиях ЧФ при ICSI с полученными хирургическим путём и замороженными сперматозоидами значимым образом не отличалась от ЧФ при ICSI с использованием сперматозоидов сразу после их хирургической экстракции [92, 95, 103, 113, 119]. Также в клиническом исследовании De Croo et al. не отмечено различия между тестикулярными и эпидидимальными сперматозоидами в плане результативности ICSI [72].

1.6 Перспективные технологии для оказания помощи парам с мужским фактором бесплодия и НОА

Было предложено экстракорпоральное оплодотворение незрелыми гаметами и *in vitro* культивирование этих клеток для того, чтобы преодолеть случаи бесплодия, при которых не удаётся получить зрелые сперматозоиды [51]. ICSI с

использованием незрелых гамет, таких как продолговатые и круглые сперматиды, даёт неоднозначные результаты, и несмотря на сообщения о рождении здорового потомства, этот метод в своём виде на сегодняшний день имеет очень низкую эффективность. Из соображений этики и безопасности, исходя из риска передачи грубых геномных нарушений потомству, технология интрацитоплазматической инъекции сперматид запрещена в ряде стран, включая Великобританию [211]. Сперматозоиды человека являются высокоспециализированными клетками, которые не только доставляют отцовскую ДНК к яйцеклетке, но и вносят значительный эпигенетический вклад в эмбриогенез. Это требует наличия достаточного количества регуляторных элементов хроматина, необходимых для активации или подавления экспрессии определённых генов после образования зиготы [115]. Тем не менее, у японских репродуктологов (Tanaka et al.) есть существенный опыт в экстракорпоральном оплодотворении с использованием круглых сперматид, и их данные наблюдения за 90 детьми до 2-летнего возраста не указывают на какие-либо различия в физическом или когнитивном развитии [192].

Вспомогательные репродуктивные технологии в общепринятом понимании требуют использования зрелых гамет, поэтому существует другая перспективная область инновационных исследований, направленных на полноценную дифференциацию существующих незрелых гамет или получение сперматозоидов из соматических клеток [28]. Японским учёным удалось использовать стволовые клетки мышечных эмбрионов для создания примордиальных герминальных клеток, которые дифференцировались в сперматозоиды после трансплантации яичка у мышей [174]. Описан процесс создания *in vitro* гаплоидных клеток из плюрипотентных стволовых клеток соматического происхождения человека [47, 76]. Все эти методы остаются экспериментальными и долгое время не будут транслированы в клиническую практику.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Общая характеристика пациентов

При проведении исследования использовалась база данных пациентов с азооспермией из бесплодных пар, подвергшихся по крайней мере одной попытке хирургического получения сперматозоидов в НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

Были сформулированы следующие критерии включения:

- мужской пол (социальный и биологический);
- возраст > 18 лет;
- азооспермия, подтверждённая дважды при анализе семенной жидкости;
- по крайней мере одна попытка хирургического получения сперматозоидов в рамках протокола вспомогательных репродуктивных технологий;
- пациенты с ретроградной эякуляцией, с отсутствием сперматозоидов в посторгазменной моче
- доступные полноценные данные лабораторных, инструментальных и гистологических исследований.

Критерии исключения были сформулированы следующим образом:

- наличие соматических заболеваний, препятствующих выполнению биопсии яичка / придатка яичка;
- невозможность оценки репродуктивных исходов ICSI в паре путём анализа базы данных, опроса при контрольной явке, телефонного звонка или ответа на e-mail

В базу данных вошло 754 пациента (сплошная выборка). Регистрировались и оценивались такие параметры, как возраст пациентов, возраст и состояние здоровья супруги, длительность периода вынужденного бесплодия, наличие сопутствующих заболеваний, наличие варикоцеле, воздействие неблагоприятных внешних факторов, перенесённые операции, а также генетические, гормональные, ультразвукографические и гистологические параметры.

Всего этим пациентам было выполнено 813 попыток хирургического получения сперматозоидов. Пятидесяти пяти пациентам выполнено 2 биопсии яичка, 4 пациентам произведено по 3 попытки получения сперматозоидов. Попытки хирургического получения сперматозоидов выполнялись по методике, принятой в отделении андрологии и урологии НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова, которая будет описана в следующем разделе этой главы.

Общая характеристика пациентов представлена в таблице 1. Нормальность распределения значений переменных оценивалась с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Практически все изучаемые показатели имели ненормальный характер распределения и потому представлены в виде медианы и межквартильного размаха (МКР).

Таблица 1 – Исходные параметры пациентов

	<i>Медиана</i>	<i>МКР</i>	<i>Диапазон</i>
Возраст (в годах)	33	8	19 – 82
Возраст жены (в годах)	30	6	18 – 53
Тестостерон (нмоль/л)	12.11	10.42	0.5 – 59
Эстрадиол (пмоль/л)	89.5	77	449.7
Индекс Т / Е2	142.9	175.3	6 – 92666.7
ФСГ (мЕд/мл)	12	17.85	0.07 – 122
ЛГ (мЕд/мл)	6.45	8	0.09 – 96
Ингибин В (пг/мл)	68	96.25	0.1 – 456
Пролактин (мЕд/л)	232	204.25	3.78 – 1719
Прогестерон (нмоль/л)	1.5	8.3	0.01 – 8.3
Объём яичек (см ³)	17	13	1.09 – 70

У 216 пациентов (28.6%) исходя из дооперационных клинических данных была диагностирована ОА, а у 525 пациентов была диагностирована НОА (69.6%). Окончательно форму азооспермии устанавливали при получении результатов гистологического исследования. У 10 пациентов (1.3%) попытки хирургического получения сперматозоидов производились при тяжёлой эякуляторной дисфункции (анэякуляция или ретроградная эякуляция) в связи с отсутствием эффективности виброэякуляции или электроэякуляции, недостаточным качеством сперматозоидов полученных при катетеризации мочевого пузыря или отказом пациента от использования этих методик в пользу биопсии яичка.

У 135 пациентов (23.5%) продолжительность периода вынужденного бесплодия составляла 1-2 года, у 432 пациентов (57.7%) – от 2 до 5 лет, у 187 пациентов (24.8%) – более 5 лет. При этом в 49 случаях у партнёрши была гинекологическая патология, способная повлиять на результаты ВРТ. У 10 мужчин в выборке был сахарный диабет. Двести пятьдесят шесть пациентов (33.9%) регулярно посещали баню, сауну или принимали горячие ванны. Триста четыре пациента (40.3%) курили сигареты, 72 пациента (9.5%) злоупотребляли спиртными напитками. Под злоупотреблением алкоголем понимали употребление более 15 стандартных доз спиртного в неделю; под стандартной дозой спиртного – объём напитка, содержащий 14 г этанола.

У 214 пациентов (28.4%) на момент выполнения процедуры получения сперматозоидов было варикоцеле, у 176 (23.3%) из них – двустороннее варикоцеле. Из числа мужчин, у которых не было варикоцеле при планировании процедуры хирургического получения сперматозоидов, 65 (8.6%) ранее подвергались субингвинальной операции Мармара и 27 (3.6%) – супраингвинальной варикоцелэктомии (операция Иванисевича или лапароскопическое клипирование внутренней яичковой вены). У 51 пациента (6.8%) в анамнезе были травмы органов мошонки. Тридцать четыре пациента (4.5%) перенесли грыжесечение в связи с наличием паховой грыжи. Другие 34 пациента (4.5%) перенесли орхипексию в

детском возрасте в связи с крипторхизмом. Семь пациентов подвергались ранее гидроцелэктомии.

Биохимические признаки гипогонадизма по критерию ISSAM были у 347 пациентов (46%). Лишь у двух мужчин был подтверждён гипогонадотропный гипогонадизм. У 104 пациентов (13.8%) был нормогонадотропный гипогонадизм, у 240 пациентов был гипергонадотропный гипогонадизм (31.8%). Гормональную стимуляцию перед биопсией яичка получали 656 пациентов (87%). Для стимуляции сперматогенеза использовались препараты хорионического гонадотропина человека для внутримышечного введения.

Один пациент 30-летнего возраста, который в прошлом перенёс вазэктомию, подвергся попытке хирургического получения сперматозоидов с одновременной вазовазостомией. Два пациента имели ОА, связанную с перенесённой радикальной простатэктомией по поводу рака предстательной железы. Возраст этих двух пациентов составил 41 и 82 года соответственно. Также в выборку вошёл пациент 27 лет, перенесший радикальную цистпростатвезикулэктомию с деривацией мочи по Брикеру в связи с раком мочевого пузыря.

Тринадцать пациентов (1.7%) имели в анамнезе злокачественные опухоли, выполненная по поводу которых химиотерапия или лучевая терапия могла вызвать гибель герминогенного эпителия с последующим развитием НОА. Шесть пациентов перенесли цитотоксическую химиотерапию, один перенёс лучевую терапию. Ещё шесть пациентов подвергались сочетанной химиолучевой терапии.

Генетические причины азооспермии были выявлены у 95 пациентов (12.6%). У 27 пациентов (3.6%) при кариотипировании был диагностирован синдром Кляйнфельтера 47,XXY; у одного из них отмечался мозаичный вариант аномалии. У 20 пациентов были выявлены хромосомные аномалии, среди которых идентифицированы: 46XY inv(X)(p21q24), 46XY del(Y)(q12), 46XYqh-, 46XY 9qh+, 46XY 16qh+, 46XY 20qh+, 46XY 13pstk 27pstk+, 46X del(Y)(q1123), 45XY (транслокация Робертсона). Мутации гена CFTR выявлены у 14 пациентов без клинических проявлений, указывающих на муковисцидоз. Любопытно, что при

этом лишь у двух пациентов с положительным CFTR-статусом отмечено врождённое двустороннее отсутствие семявыносящих протоков. У одного пациента причиной бесплодия был синдром резистентности к андрогенам (синдром Рейфенштейна).

Мутации AZF-фактора выявлены у 41 пациента (5.4%): в локусе AZFb в одном случае, AZFc – в 34 случаях, AZFbc – в 6 случаях. Пациентов с мутациями AZFb и AZFbc предупреждали о крайне низкой вероятности успеха процедуры получения сперматозоидов, но они настояли на её выполнении из-за отчаянного стремления иметь собственное биологическое потомство. В одном случае мутация в локусе AZFc сочеталась с синдромом Кляйнфельтера. Наблюдался один случай сочетания мутации AZFbc с делецией в q1123 Y-хромосомы. В четырёх случаях мутация AZFc сочеталась с хромосомной аномалией, выявленной при кариотипировании. Комбинация мутации CFTR с AZFb наблюдалась в одном случае, а с AZFc – в двух случаях.

2.2 Техника выполнения биопсии яичка

При выполнении биопсии яичка у всех пациентов использовался операционный микроскоп. После обработки операционного поля проводился разрез по линии Веслинга, протяжённость которого зависела от объёма яичек (рисунок 1). Мясистая оболочка мошонки рассекалась с помощью пинцета-коагулятора, после чего одно из яичек выводилось в операционную рану. Влагалищная оболочка яичка приподнималась двумя пинцетами, чтобы не повредить при её рассечении само яичко (рисунок 2). После вскрытия влагалищной оболочки эвакуировалась водяночная жидкость при её наличии.



Рисунок 1 – Разрез по средней линии мошонки



Рисунок 2 – Послойное вскрытие оболочек яичка

Следующим этапом проводилась попытка процедуры MESA (микрохирургическая аспирация сперматозоидов из придатка яичка). Для этого под 10-15-кратным увеличением остроконечным скальпелем производилось вскрытие оболочки придатка яичка в области его головки над визуально полноценными канальцами. После вскрытия канальцев придатка выполнялась мануальная аспирация их содержимого с помощью шприца с канюлей от внутривенного катетера. Полученный материал отдавали на исследование эмбриологу. Далее проводилась аналогичная процедура в области тела придатка. Дефект в оболочке придатка ушивался с помощью монокрила 6/0.

Дальнейшая последовательность действий определялась в зависимости от того, были ли обнаружены сперматозоиды при MESA. В том случае, когда в эпидидимальной жидкости эмбриологу удавалось обнаружить сперматозоиды, мы делали вывод о том, что сперматогенез в яичке является относительно сохранным, а потому не считали микродиссекционную TESE необходимой. Однако, учитывая возможный обратный градиент качества сперматозоидов в условиях обструктивной азооспермии, мы выполняли также мультифокальную стандартную TESE для получения материала из яичка для гистологического исследования и возможного применения в ICSI. Для этого с помощью остроконечного скальпеля совершался небольшой разрез белочной оболочки яичка в трёх участках по латеральной и в трёх участках по медиальной поверхности. При мануальной компрессии на яичко происходило выпячивание семенных канальцев из этих разрезов, что позволяло захватить их пинцетом и отделить острым путём от основной массы тестикулярной паренхимы. Кровотечение контролировалось с помощью биполярной коагуляции до снятия компрессии с яичка, так как преждевременное уменьшение давления на яичко приводит к миграции мелких кровоточащих сосудов обратно в яичко, где, учитывая архитектуру семенных канальцев, найти их снова через мелкий надрез белочной оболочки оказывается проблематичным, что чревато формированием гематомы в послеоперационном периоде. Обычно таким образом получали по 6 фрагментов ткани яичка, которые

отдавали эмбриологу для обработки материала и поиска сперматозоидов, а часть материала направляли на гистологическое исследование.

При отсутствии сперматозоидов в материале, аспирированном из придатка, выполняли попытку получения тестикулярных сперматозоидов при помощи микродиссекционной TESE. Для этого производили экваториальный разрез по передней полуокружности яичка, по возможности избегая крупных сосудов под белочной оболочкой (рисунок 3). С помощью пинцетов захватывали края рассечённой белочной оболочки и выворачивающим движением раскрывали содержимое яичка. Под 25-кратным оптическим увеличением послойно осматривали семенные канальцы, забирая фрагменты ткани для дальнейшего поиска сперматозоидов. Особое внимание при этом уделялось поиску участков с визуально отличающимися белесоватыми «наполненными» канальцами, в которых наиболее велика вероятность обнаружения сперматозоидов (рисунок 4). Несколько фрагментов отправляли на гистологическое исследование. В условиях кровотечения адекватная визуализация поддерживалась с помощью ирригации физиологическим раствором хлорида натрия. Кровотечение контролировалось с помощью биполярной электрокоагуляции микроинструментом.



Рисунок 3 – Разрез по полуокружности яичка при microTESE



Рисунок 4 – Участок канальцев с высокой вероятностью сохранённого сперматогенеза

Белочная оболочка яичка ушивалась непрерывно с помощью викрила 4/0. Затем ушивалась влагалищная оболочка. В операционную рану выводилось контралатеральное яичко, после чего вышеописанная процедура повторялась. На завершающем этапе операции контролировалось качество гемостаза, с помощью узловых швов из рассасывающегося материала ушивалась tunica dartos. Разрез по срединной линии мошонки ушивался по методике Донатти с чередованием расположения узла по левую и правую стороны от разреза. Стандартный алгоритм выполнения попытки хирургического получения сперматозоидов продемонстрирован на рисунке 5.



Рисунок 5 – Алгоритм стандартной попытки хирургического получения сперматозоидов

2.3 Оценка репродуктивных исходов

При оценке репродуктивных исходов мы ориентировались главным образом на частоту получения сперматозоидов и частоту рождения живых детей. Данные показатели подсчитаны как для всей нашей выборки, так и для пациентов с ОА и НОА по отдельности. Для пар, в которых мужчине проводилось 2 или 3 попытки хирургического получения сперматозоидов, определены параметры ЧПС и ЧРД для повторных попыток с учётом гистологического заключения, полученного после первой биопсии.

Мы сравнили ЧПС, ЧРД и количество циклов ICSI, потребовавшихся для рождения ребёнка, у пациентов с варикоцеле и без варикоцеле, а также у тех, кто когда-то уже подвергся хирургическому лечению варикоцеле. Оценка статистической значимости проводилась с помощью критерия хи-квадрат Пирсона.

Отдельно обсуждались немногочисленные (до 40 случаев) и единичные наблюдения, представляющие особый интерес, но не подходящие по понятным причинам для подсчёта показателей ЧПС и ЧРД.

2.4 Выявление предикторов успешного репродуктивного исхода

Для определения предикторов успеха попытки хирургического получения сперматозоидов мы построили модель логистической регрессии, в которую вошла зависимая бинарная переменная (0 - отсутствие сперматозоидов при биопсии; 1 - успешное получение сперматозоидов при биопсии) и набор потенциально влияющих на неё факторов:

- возраст пациента;
- номер попытки биопсии;
- длительность вынужденного бесплодия;

- уровень половых гормонов (тестостерон, эстрадиол, ЛГ, ФСГ, пролактин, ингибин В);
- суммарный объём яичек по данным ультразвукового исследования органов мошонки;
- наличие синдрома Кляйнфельтера;
- наличие хромосомных аномалий;
- наличие делеций в регионе AZF Y-хромосомы;
- наличие мутаций гена муковисцидоза (CFTR);
- наличие варикоцеле (одностороннего или двустороннего);
- наличие химиотерапии или лучевой терапии в анамнезе;
- наличие сахарного диабета;
- злоупотребление алкоголем;
- табакокурение;
- регулярное нарушение теплового режима (горячие ванны, посещение бани или сауны);
- перенесённые оперативные вмешательства в пахово-мошоночной области (варикоцелэктомия, гидроцелэктомия, грыжесечение, орхипексия).

Отдельная модель логистической регрессии для рождения ребёнка в результате ICSI включала дополнительно вид азооспермии, наличие гинекологической патологии и возраст женщины.

Синдром Рейфенштейна, врождённое двустороннее отсутствие семявыносящих протоков, вазэктомия в анамнезе и некоторые другие факторы в данном анализе не учитывались из-за малого числа наблюдений.

Оценивалась статистическая значимость модели логистической регрессии в целом, значимость входящих в неё переменных и отношение вероятностей (ОВ) успешного получения сперматозоидов с 95%-ным доверительным интервалом (95% ДИ) для каждого фактора, подтвердившего свою значимость.

Дополнительно проводился анализ с построением древа классификации (древо принятия решений) по методу хи-квадрат для выделения категорий пациентов с разной вероятностью успешного получения сперматозоидов.

Проведён анализ рабочей характеристики приёмника (ROC-анализ) для оценки количественных переменных как потенциальных маркеров результата биопсии яичка.

У пациентов с ОА, у которых получалось в достаточном количестве за одну процедуру получить эпидидимальные и тестикулярные сперматозоиды, проводился анализ на индекс фрагментации ДНК, который является суррогатным маркером результата ВРТ и успешного вынашивания беременности. Фрагментация ДНК сперматозоидов определялась с помощью метода TUNEL. Этот параметр сравнивался у сперматозоидов из яичка и его придатка.

2.5 Оценка гистологических результатов

Мы отдельно анализировали структуру гистологических заключений по материалу, полученному при биопсии яичка по поводу азооспермии. Оценивалась частота различных гистологических паттернов в тестикулярном материале.

Проведена оценка частоты получения сперматозоидов при разной гистологической картине. Отдельно сопоставлялась вероятность получения сперматозоидов при повторной биопсии и результат гистологического исследования при первичной биопсии.

После получения результатов морфологического исследования окончательно определялся вид азооспермии (ОА / НОА). У части пациентов на основании клинических данных исходно неверно диагностировалась ОА, тогда как гистологическое исследование идентифицировало выраженные признаки нарушения сперматогенеза, характерные для НОА (гипосперматогенез, остановка сперматогенеза, синдром клеток Сертоли). Для поиска причин ошибочной

классификации азооспермии была построена модель логистической регрессии, учитывающая следующие факторы:

- возраст пациента;
- уровень половых гормонов (пролактин, прогестерон, эстрадиол);
- наличие варикоцеле (одностороннего или двустороннего);
- наличие сахарного диабета;

перенесённые оперативные вмешательства в пахово-мошоночной области (варикоцелэктомия, гидроцелэктомия, грыжесечение, орхипексия)

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Частота успеха хирургических методов получения сперматозоидов у пациентов с азооспермией

Полные данные, включая репродуктивные исходы, были доступны лишь для 707 попыток хирургического получения сперматозоидов из 813, исходно вошедших в базу. Дальнейший анализ частоты получения сперматозоидов производился с учётом только этих 707 попыток. В 132 случаях это была перкутанная аспирация сперматозоидов из яичка и его придатка (PESA / TESA) при предположительно обструктивном характере азооспермии. В остальных случаях это была открытая биопсия яичка с использованием микрохирургической техники.

Сперматозоиды приемлемого качества были получены в количестве, достаточном для криоконсервации или использования в протоколе ICSI, в 289 случаях из 707; таким образом, общая ЧПС составила 40.9%. После учёта результатов гистологического исследования для окончательного определения вида азооспермии ЧПС при НОА составила 31.1% (188 из 605 попыток), ЧПС при ОА составила 100% (все 96 попыток). При эякуляторной дисфункции были успешными 5 из 6 попыток хирургического получения сперматозоидов.

Нами был проведён логистический регрессионный анализ для выявления факторов, которые могут повлиять на вероятность успешного получения сперматозоидов у пациентов с азооспермией. Результаты анализа представлены в таблице 2.

Уровень ФСГ (ОВ = 0.966; 95% ДИ = 0.940–0.992), уровень тестостерона (ОВ = 0.965; 95% ДИ = 0.936–0.995) и мутации AZFc (ОВ = 0.305; 95% ДИ = 0.094–0.983) были негативно связаны с вероятностью получения сперматозоидов. Значимыми положительными предикторами оказались уровень ингибина В (ОВ = 1.011; 95% ДИ = 1.007–1.015), объём яичек (ОВ = 1.100; 95% ДИ = 1.068–1.132) и орхипексия,

выполненная в детстве по поводу крипторхизма (ОВ = 2.979; 95% ДИ = 1.209–7.335).

Таблица 2 – Результаты логистического регрессионного анализа факторов, способных повлиять на вероятность успеха хирургического получения сперматозоидов

<i>Предикторы получения сперматозоидов</i>	<i>ОВ</i>	<i>95% ДИ</i>	<i>P</i>
Возраст (на 1 год)	1.023	0.990–1.057	0.178
Длительность бесплодия в браке	0.801	0.550–1.167	0.248
Номер попытки получения сперматозоидов	1.969	0.956–4.056	0.066
Варикоцеле	0.765	0.483–1.210	0.252
Сахарный диабет	2.537	0.420–15.330	0.311
Нарушения температурного режима	1.020	0.668–1.558	0.926
Табакокурение	1.481	0.935–2.348	0.094
Злоупотребление алкоголем	1.176	0.569–2.430	0.662
Синдром Кляйнфельтера	0.582	0.117–2.892	0.492
Хромосомные аномалии	0.292	0.041–2.071	0.218
Мутации CFTR	1.779	0.328–9.652	0.505
Мутации AZFc	0.305	0.094–0.983	0.047
Уровень ингибина В (на 1 пг/мл)	1.011	1.007–1.015	< 0.001
Уровень ФСГ (на 1 мМЕ/мл)	0.966	0.940–0.992	0.011
Уровень ЛГ (на 1 мМЕ/мл)	1.021	0.993–1.050	0.149
Уровень тестостерона (на 1 нмоль/л)	0.965	0.936–0.995	0.022

Продолжение таблицы 2

Уровень прогестерона (на 1 нмоль/л)	1.035	0.845–1.266	0.741
Уровень пролактина (на 1 мкМЕ/мл)	0.999	0.998–1.001	0.385
Уровень эстрадиола (на 1 пмоль/л)	0.999	0.995–1.002	0.556
Суммарный объём яичек (на 1 см ³)	1.100	1.068–1.132	< 0.001
Варикоцелэктомия в анамнезе	0.680	0.357–1.295	0.241
Гидроцелэктомия в анамнезе	1.546	0.746–3.206	0.957
Орхипексия в анамнезе	2.979	1.209–7.335	0.018
Паховое грыжесечение в анамнезе	0.555	0.255–1.209	0.917
Травма мошонки в анамнезе	1.380	0.627–3.037	0.424

В финальную выборку вошли два пациента с врождённым отсутствием семявыносящих протоков и мутациями гена CFTR. У них удалось получить сперматозоиды из придатка яичка при MESA, и у супруги одного из них родился здоровый ребёнок в результате ICSI с преимплантационной генетической диагностикой.

У 2 пациентов, которым выполнялась биопсия яичка после радикальной простатэктомии, удалось с первой попытки получить сперматозоиды, которые в дальнейшем были использованы для ICSI, в результате чего с первой попытки произошло рождение здоровых детей. У пациента после радикальной цистпростатвезикулэктомии удалось получить сперматозоиды в достаточном количестве для криоконсервации, однако единственная на данный момент попытка ICSI у его супруги оказалась неудачной.

В целом, этиология необструктивной азооспермии, за исключением мутаций региона AZF, практически не влияла на вероятность успеха хирургического получения сперматозоидов. У одного пациента с синдромом Рейфенштейна

сперматозоиды получить не удалось: гистологическое исследование тестикулярной паренхимы продемонстрировало гипосперматогенез и атрофические изменения канальцев, однако повторная биопсия этому пациенту не выполнялась. Как и следовало ожидать, у всех 6 пациентов с наличием мутаций в регионе AZFb сперматозоидов обнаружено не было; у 4 из них при гистологическом исследовании выявлен сертоликлеточный синдром, а у других 2 – тяжёлый гипосперматогенез с почти полной атрофией канальцев яичка.

Был проведён анализ кривых рабочей характеристики приёмника (ROC-анализ) непрерывных переменных, которые в клинической практике могут использоваться как маркеры вероятности получения сперматозоидов в результате хирургических процедур (уровень ФСГ, тестостерона, ингибина В, объём яичек). ROC-кривые продемонстрированы на рисунках 6 и 7.

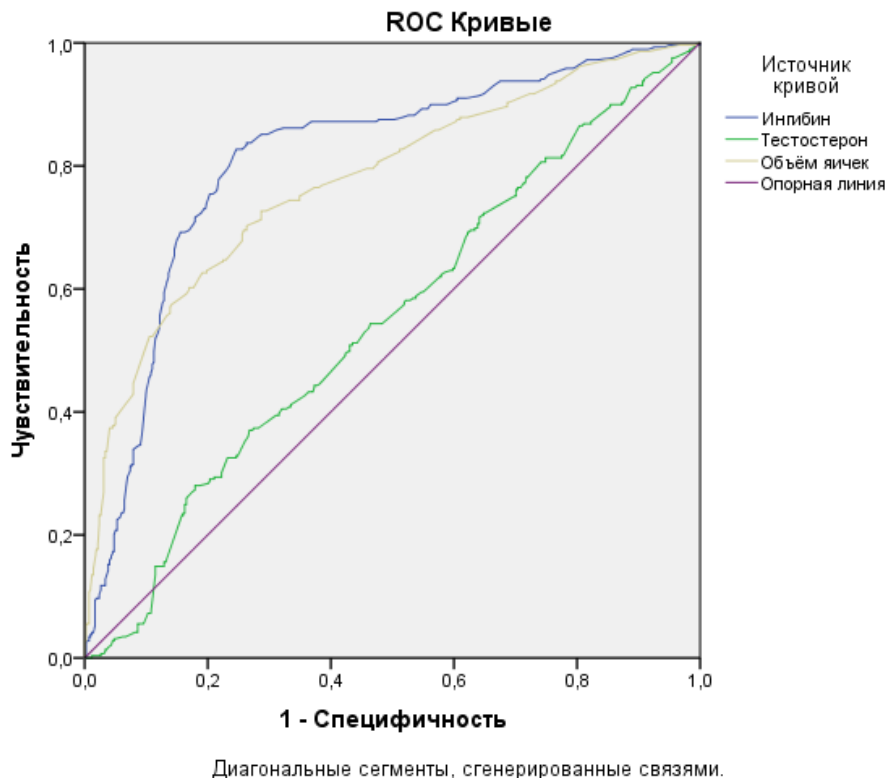
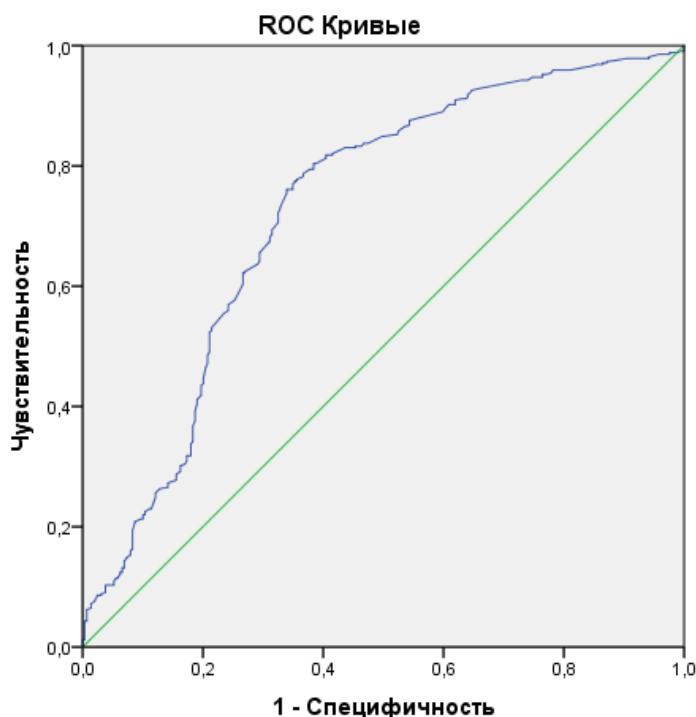


Рисунок 6 – ROC-кривые для тестостерона, ингибина В и объёма яичек как маркеров успешного получения сперматозоидов



Диагональные сегменты, сгенерированные связями.

Рисунок 7 – ROC-кривая для уровня ФСГ как маркера неудачных попыток получения сперматозоидов

Все переменные, за исключением уровня тестостерона, оказались потенциальными маркерами успеха биопсии яичка ($AUC > 0.7$), хотя ни один из них не был достаточно достоверным для того, чтобы служить самостоятельным предиктором ($AUC > 0.9$). В таблице 3 указаны показатели площади под кривой (AUC) с 95%-ными интервалами.

Таблица 3 – Результаты ROC-анализа потенциальных маркеров результативности биопсии яичка

<i>Маркер получения сперматозоидов</i>	<i>AUC</i>	<i>95% ДИ</i>
Объём яичек	0.776	0.740–0.811
Уровень тестостерона	0.548	0.505–0.591
Уровень ФСГ	0.726	0.687–0.766
Уровень ингибина В	0.812	0.778–0.845

Ориентируясь на наиболее значимые маркеры успешного получения сперматозоидов при биопсии яичка удалось построить древо принятия решений для выделения категорий пациентов с различной вероятностью благоприятного результата. Наилучшие результаты попыток хирургического получения сперматозоидов наблюдались в группе пациентов с уровнем ингибина В более 89 пг/мл и суммарным объёмом яичек более 22.7 см³ – в этой категории ЧПС составила 87%. Минимальная ЧПС наблюдалась у пациентов с уровнем ингибина В менее 68 пг/мл и ФСГ в диапазоне от 15.1 до 19.7 мМЕ/мл. В этой группе сперматозоиды не были получены ни в одном случае из нашей выборки. Любопытно, что при уровне ингибина В менее 68 пг/мл и более высоком уровне ФСГ (> 19.7 мМЕ/мл) процедуры хирургического получения сперматозоидов были более результативными (ЧПС 12%). Древо принятия решений в отношении получения сперматозоидов продемонстрировано на рисунке 8.

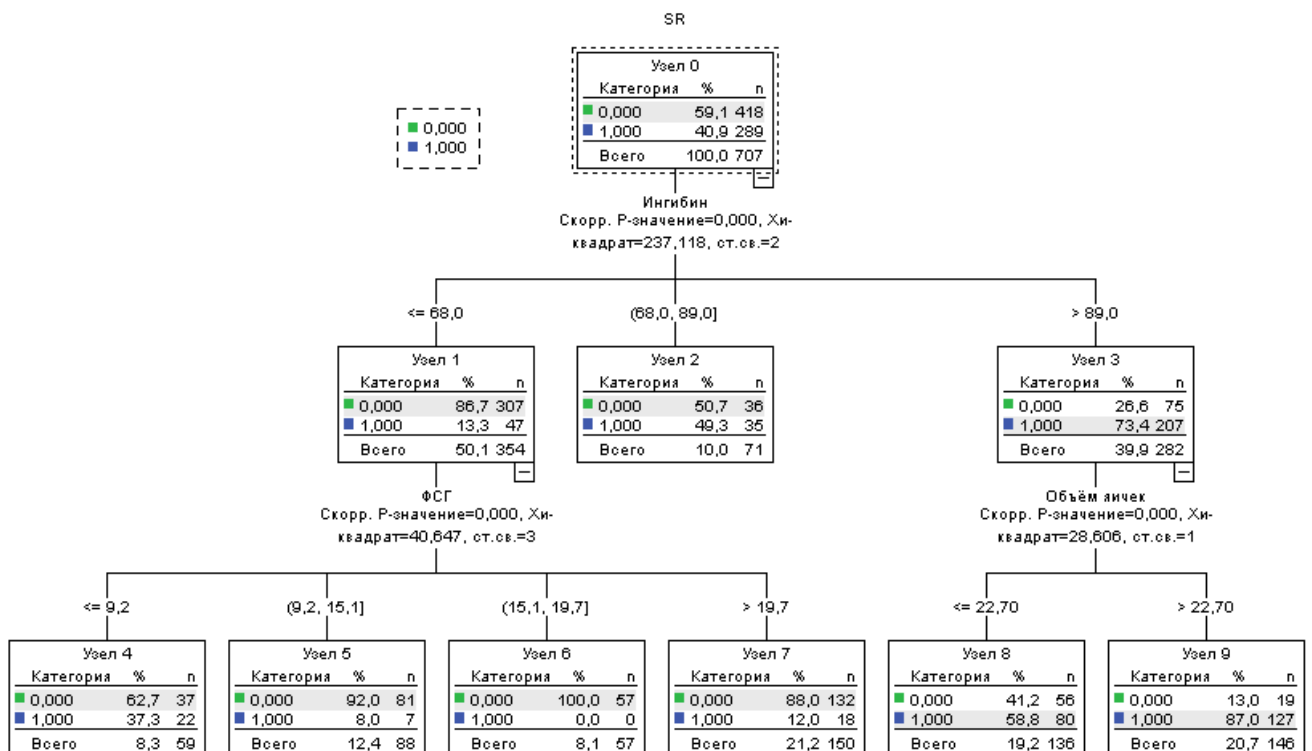


Рисунок 8 – Древо классификации для определения групп пациентов с разной ЧПС

Напрямую сравнивать ЧПС при PESA / TESA и MESA / TESE у пациентов с клинически диагностированной ОА было бы некорректно из-за направленного отбора пациентов (selection bias), так как для пункционной биопсии заведомо отбирались пациенты с благоприятными клиническими и лабораторными характеристиками. MESA и TESE, напротив, зачастую выполнялись пациентам после неудач PESA / TESA, а также после безрезультатных TESE, выполненных в других центрах.

Мы провели отдельный анализ по вероятности получения сперматозоидов при процедуре PESA / TESA у пациентов с подозрением на ОА. Результаты логистического регрессионного анализа продемонстрированы в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты логистического регрессионного анализа факторов, способных повлиять на вероятность успеха PESA / TESA

<i>Предикторы получения сперматозоидов</i>	<i>ОВ</i>	<i>95% ДИ</i>	<i>P</i>
Возраст (на 1 год)	1.026	0.947–1.112	0.530
Длительность бесплодия в браке	0.625	0.232–1.682	0.352
Варикоцеле	0.479	0.101–2.273	0.354
Нарушения температурного режима	0.506	0.119–2.153	0.356
Табакокурение	2.107	0.582–7.629	0.256
Злоупотребление алкоголем	3.780	0.412–34.638	0.239
Уровень ингибина В (на 1 пг/мл)	1.026	1.011–1.041	< 0.001
Уровень ФСГ (на 1 мМЕ/мл)	1.024	0.867–1.209	0.784
Уровень ЛГ (на 1 мМЕ/мл)	0.965	0.817–1.140	0.673
Уровень тестостерона (на 1 нмоль/л)	0.942	0.854–1.040	0.239
Уровень прогестерона (на 1 нмоль/л)	1.320	0.750–2.325	0.336

Продолжение таблицы 4

Уровень пролактина (на 1 мкМЕ/мл)	0.998	0.994–1.001	0.226
Уровень эстрадиола (на 1 пмоль/л)	1.005	0.994–1.016	0.399
Суммарный объём яичек (на 1 см ³)	1.113	1.026–1.207	0.010
Варикоцелэктомия в анамнезе	0.228	0.024–2.132	0.195
Орхипексия в анамнезе	0.000	0.000–>9999	0.999
Паховое грыжесечение в анамнезе	> 9999	0.000–>9999	0.999
Травма мошонки в анамнезе	0.502	0.090–2.798	0.432
Химиолучевая терапия в анамнезе	0.000	0.000–>9999	1.000

Таким образом, единственными статистически значимыми положительными предикторами успеха пункционной биопсии были уровень ингибина В (ОВ = 1.026; 95% ДИ = 1.011–1.041) и объём яичек (ОВ = 1.113; 95% ДИ = 1.026–1.207). Эмпирически было установлено, что шансы на успешное получение сперматозоидов при пункции велики у тех пациентов, у кого уже были успешные пункционные биопсии в прошлом, но криоконсервированного материала оказалось недостаточно или по различным причинам потребовалась fresh-биопсия. Из-за малой численности подобных наблюдений этот фактор не включался в регрессионный анализ.

Всего в нашей выборке было 132 пункционных биопсии, 92 из которых были успешными (69.7%). В остальных 40 случаях выполнялась конверсия в открытую микрохирургическую биопсию по плану, представленному на рисунке 5. В 25 случаях (18.9%) удалось получить сперматозоиды в достаточном количестве с помощью MESA у пациентов с перенесённым острым эпидидимитом в анамнезе (n = 22), у двух пациентов, перенесших иссечение кист придатков яичек, и у одного пациента с врождённым двусторонним отсутствием семявыносящих протоков. В 7

случаях (5.3%) при MESA были обнаружены единичные сперматозоиды с аномальной морфологией, но гаметы в достаточном количестве были успешно получены с помощью мультифокальной TESE: это были 5 пациентов с острым эпидидимитом в анамнезе, 1 пациент с предполагаемой продолжительностью обструкции более 15 лет (паховое грыжесечение в детстве) и 1 пациент после трёх попыток PESA, выполненных в центре планирования семьи по месту жительства. Наконец, в 8 случаях (6.1%) мы прибегали к microTESE: это были два пациента с тяжёлым орхоэпидидимитом в анамнезе, у которых были получены сперматозоиды, а гистологическое исследование подтвердило необструктивный тип азооспермии (гипосперматогенез и атрофические изменения семенных канальцев), и один пациент с идиопатической НОА на фоне нормальных клинико-лабораторных параметров (100% СКС, сперматозоиды не получены). У оставшихся 5 пациентов с нормальными показателями уровня гормонов (в том числе с нормальным уровнем ингибина В) и нормальным тестикулярным объёмом сперматозоиды не были получены даже при microTESE, при которой паренхима яичек имела однородный внешний вид с «пустыми» семенными канальцами. Гистологическое исследование продемонстрировало у всех этих пациентов остановку сперматогенеза на этапе круглых сперматид.

3.2 Частота рождения детей после ICSI с использованием сперматозоидов, полученных хирургическим путём у пациентов с азооспермией

Частота рождения детей в нашей выборке составила 17.5% в пересчёте на попытки получения сперматозоидов. У 18.9% пациентов с азооспермией за период наблюдения удалось добиться рождения ребёнка. Реальная частота рождения детей может оказаться выше, учитывая то, что криоконсервированные сперматозоиды могут быть использованы для повторных попыток ICSI в будущем. При НОА показатель ЧРД составил 12.9%, а при ОА – 45.8%, что примерно соответствует частоте успеха ВРТ в стандартных условиях. Однако, при подсчёте только в тех

парах, где сперматозоиды были успешно получены при биопсии яичка, ЧРД была практически одинаковой при ОА и НОА, составляя 48.9% и 48.1% соответственно.

Выполнен анализ логистической регрессии в отношении факторов, потенциально влияющих на вероятность рождения ребёнка при использовании сперматозоидов, полученных хирургическим путём. Для построения регрессионной модели использовались данные 256 успешных попыток хирургического получения сперматозоидов. Ещё у 33 пациентов сперматозоиды были успешно получены и криоконсервированы, но по какой-либо причине пока не использованы в протоколе ВРТ на момент сбора информации и выполнения анализа, поэтому эти данные не включались в модель. Результаты регрессионного анализа показаны в таблице 5. Значимыми негативными предикторами рождения ребёнка при ICSI с использованием полученных хирургическим путём сперматозоидов были возраст женщины ($OR = 0.909$; 95% ДИ = 0.840–0.983) и наличие гинекологических заболеваний, способных повлиять на имплантацию эмбриона и успешное протекание беременности ($OR = 0.362$; 95% ДИ = 0.149–0.882). Положительных предикторов выявлено не было.

Таким образом, в случае успешного получения сперматозоидов ни один из рассматриваемых андрологических факторов не оказывал влияния на вероятность успеха ВРТ и рождения живого ребёнка.

Таблица 5 – Результаты логистического регрессионного анализа факторов, способных повлиять на вероятность рождения ребёнка после ICSI с использованием полученных хирургическим путём сперматозоидов

<i>Предикторы рождения ребёнка</i>	<i>OR</i>	<i>95% ДИ</i>	<i>P</i>
Возраст мужчины (на 1 год)	1.050	0.992–1.111	0.090
Возраст женщины (на 1 год)	0.909	0.840–0.983	0.017
Обструктивная азооспермия	2.920	0.278–30.643	0.372
Необструктивная азооспермия	1.985	0.201–19.588	0.557

Продолжение таблицы 5

Наличие гинекологических заболеваний	0.362	0.149–0.882	0.025
Длительность бесплодия в браке	0.734	0.447–1.207	0.223
Варикоцеле	1.496	0.770–2.907	0.235
Нарушения температурного режима	1.469	0.852–2.532	0.167
Табакокурение	0.679	0.362–1.274	0.228
Злоупотребление алкоголем	0.561	0.222–1.418	0.222
Синдром Кляйнфельтера	1.201	0.054–26.919	0.908
Хромосомные аномалии	0.520	0.024–11.400	0.678
Мутации CFTR	2.290	0.457–11.473	0.314
Мутации AZFc	0.000	0.000–>9999	0.999
Уровень ингибина В (на 1 пг/мл)	1.001	0.996–1.006	0.704
Уровень ФСГ (на 1 мМЕ/мл)	1.005	0.957–1.055	0.853
Уровень ЛГ (на 1 мМЕ/мл)	1.000	0.948–1.054	0.994
Уровень тестостерона (на 1 нмоль/л)	0.981	0.937–1.027	0.420
Уровень прогестерона (на 1 нмоль/л)	0.824	0.618–1.100	0.189
Уровень пролактина (на 1 мкМЕ/мл)	1.000	0.998–1.002	0.898
Уровень эстрадиола (на 1 пмоль/л)	1.003	0.997–1.009	0.297
Суммарный объём яичек (на 1 см ³)	1.027	0.991–1.064	0.137
Варикоцелэктомия в анамнезе	0.801	0.315–2.036	0.640
Орхипексия в анамнезе	1.609	0.430–6.024	0.480

Продолжение таблицы 5

Химиолучевая терапия в анамнезе	1.533	0.079–29.745	0.778
---------------------------------	-------	--------------	-------

3.3 Результаты гистологического исследования ткани яичка у пациентов с необструктивной азооспермией

На рисунке 9 продемонстрирована частота преобладающих гистологических паттернов в тестикулярной паренхиме у мужчин с НОА. Весьма часто различные гистологические находки сочетались у одного и того же пациента, однако в диаграмме представлены данные именно по преобладающей картине (гистологическому заключению): в 142 случаях это был гипосперматогенез, в 156 случаях – остановка сперматогенеза, в 237 случаях – СКС. В 262 случаях наблюдались дополнительно атрофические изменения канальцев, в 17 случаях – склерогиалиноз.



Рисунок 9 – Гистологическая картина тестикулярной паренхимы у пациентов с НОА

Более подробное изучение данных гистологического исследования дало другую ценную информацию. СКС или тяжёлые атрофические изменения в 100% семенных канальцев были обнаружены в 183 случаях (30.2%). Тотальная остановка созревания половых клеток встречалась относительно редко: было отмечено лишь 9 таких наблюдений (1.5%). В 63 случаях (10.4%) сочетались паттерны СКС и остановки созревания половых клеток в разных семенных канальцах при отсутствии более продвинутых этапов сперматогенеза. В оставшихся 351 случае (57.9%) хотя бы 1% семенных канальцев содержал вытянутые сперматиды, что позволяет описать такую картину как гипосперматогенез.

Однако, лишь в малом количестве наблюдений ($n = 27$; 4.4%) индекс Бергманна-Клиш составлял 8-9 баллов, что соответствует условно нормальному сперматогенезу в месте взятия биоптата (это не позволяет охарактеризовать сперматогенез во всём яичке как нормальный). Ни у одного из пациентов индекс сперматогенеза не был равен 10. В 201 случае (33.2%) индекс Бергманна-Клиш был в диапазоне от 1 до 7, что интерпретируется как смешанная тестикулярная атрофия. В 123 случаях (20.3%) этот показатель был менее 1, что означает, что лишь в 1-9% семенных канальцев визуализировались вытянутые сперматиды. Медиана индекса сперматогенеза составила 0.6 с МКР 0–2.

Из 27 попыток биопсии яичка при индексе Бергманна-Клиш, равном 8-9, 24 были успешными (88.9%). Три неудачи были связаны с тем, что было получено недостаточно живых сперматозоидов для ICSI, несмотря на присутствие вытянутых сперматид. Поскольку в нашем центре инъекция вытянутых сперматид в ооцит не применяется, эти попытки хирургического получения сперматозоидов считались неудачными. Среди пациентов с гистологической картиной смешанной тестикулярной атрофии 85 попыток биопсии (42.3%) были успешными. Неожиданно, что при индексе сперматогенеза менее 1 успешными были 79 попыток биопсии яичка (64.2%). При тотальном СКС или тубулярной атрофии ЧПС была равна 0%.

В таблице 6 продемонстрированы показатели гормонального профиля и объём яичек у пациентов с разными вариантами преобладающей гистологической картины. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха. В колонке «АС-1» представлены показатели пациентов с арестом сперматогенеза на этапе вытянутых сперматид, а в колонке «АС-2» – на этапе круглых сперматид.

Таблица 6 – Клинические характеристики пациентов с различной гистологической картиной тестикулярной паренхимы

<i>Показатель</i>	<i>ГС</i>	<i>АС-1</i>	<i>АС-2</i>	<i>СКС</i>
Тестостерон (нмоль/л)	12.1 (10)	12 (10)	10.8 (13)	12 (9)
Эстрадиол (пмоль/л)	98 (79)	90 (74)	93 (63)	90 (81)
ФСГ (мЕд/мл)	9.1 (17)	10 (16)	12.7 (18)	17.3 (15)
ЛГ (мЕд/мл)	5.5 (7)	5.5 (8)	6.2 (9)	7.6 (9)
Ингибин В (пг/мл)	80 (89)	69.5 (93)	49.5 (99)	35 (53)
Пролактин (мЕд/л)	228 (188)	235 (191)	237.5 (243)	234 (210)
Прогестерон (нмоль/л)	1.3 (1.5)	1.5 (1.5)	1.4 (1.7)	1.5 (1.8)
Объём яичек (см ³)	18.2 (13.3)	17 (13.7)	15 (14.25)	14 (10)

Эвристически определяется определённая зависимость между эндокринными показателями (ингибин В, ФСГ, ЛГ) и тяжестью нарушения сперматогенеза, однако она сама по себе не имеет практической ценности, так как окончательный клинический результат зависит от факта получения сперматозоидов, а не от гистологической картины.

3.4 Результаты microTESE при феномене изолированного повышения уровня ФСГ

Мы провели post hoc анализ результатов microTESE при феномене изолированного повышения ФСГ, когда уровень ЛГ находился в пределах референсных значений. Было идентифицировано 145 таких пациентов. Сперматозоиды были получены у 17 из них. Таким образом, ЧПС у них была критически низкой и составила 11.7%. ЧРД в парах, к которым принадлежали эти пациенты, составила 4.8%.

Добавление логической переменной, отражающей наличие изолированного повышения уровня ФСГ, в модель логистической регрессии для определения успеха попыток хирургического получения сперматозоидов, продемонстрировало, что этот феномен является независимым отрицательным предиктором (ОВ = 0.274; 95% ДИ = 0.148–0.506; $p < 0.001$). Любопытно, что при этом номинальный уровень ФСГ потерял статус самостоятельного предиктора результата биопсии яичка ($p = 0.084$).

Результаты гистологического исследования тестикулярной паренхимы пациентов с изолированным повышением уровня ФСГ представлены на рисунке 10. Преобладающим паттерном был СКС ($n = 108, 74.5\%$). В 92 случаях это был тотальный СКС или полная атрофия канальцев, а в 1 случае наблюдалась «чистая» остановка сперматогенеза на этапе круглых сперматид. В 35 случаях сочетались признаки СКС и нарушения созревания половых клеток без более продвинутых этапов спермиогенеза. В оставшихся 17 случаях (11.7%) хотя бы 1% семенных канальцев содержали вытянутые сперматиды, а при microTESE были обнаружены сперматозоиды. В одном случае, как ни странно, индекс Бергманна-Клиш был равен 8; наблюдалось три случая смешанной тестикулярной атрофии со значениями индекса 4, 4 и 1 соответственно. В оставшихся случаях он находился в диапазоне от 0.1 до 0.8.



Рисунок 10 – Гистологическая картина тестикулярной паренхимы у пациентов с изолированным повышением уровня ФСГ

3.5 Анализ причин неверного определения разновидности азооспермии до выполнения биопсии яичка

У 216 пациентов на основании первичных данных физикальных, ультразвуковых и лабораторных методов исследования был установлен диагноз «обструктивная азооспермия». У всех этих пациентов был нормальный объём яичек, нормальный уровень половых гормонов и отсутствовали указания на очевидные анамнестические факторы, способные вызвать НОА. Тем не менее, у 131 пациента (60.6%) отмечалось расхождение первичного клинического диагноза с патогистологическими данными, которые указывали на нарушение сперматогенеза и необструктивный характер азооспермии (гипосперматогенез, остановка сперматогенеза, сертоликлеточный синдром и др.).

Что касается гистологических паттернов, выявленных у пациентов с ошибочно определённой формой азооспермии, то в 59 случаях наблюдалась

атрофия семенных канальцев, в 58 случаях – гипосперматогенез, в 25 случаях – остановка сперматогенеза на этапе вытянутых сперматид, в 14 случаях – остановка сперматогенеза на этапе круглых сперматид, в 17 случаях - сертоликлеточный синдром, и ещё в 2 случаях выявлены воспалительные изменения тестикулярной паренхимы. Общая сумма вышеприведенных наблюдений превышает 131, так как в ряде случаев разные гистологические паттерны сочетались в одном образце.

Мы построили модель логистической регрессии для определения факторов, которые позволили бы заподозрить НОА у пациентов с нормальными клинико-лабораторными параметрами. Результаты анализа представлены в таблице 7.

В модель вошли все случаи с первичным диагнозом «обструктивная азооспермия». Такие факторы, как объём яичек, уровни гонадотропинов и тестостерона, в эту модель не включались, так как они были заведомо нормальными у всех вошедших в неё пациентов. Единственным значимым фактором в модели оказалось регулярное нарушение температурного режима органов мошонки (регулярное посещение бани и сауны, работа в горячих цехах и т.п.) – ОВ для неверного определения характера азооспермии у пациентов с этим фактором составило 1.989 (95% ДИ = 1.101–3.595). Общее количество пациентов с нормальными клинико-лабораторными характеристиками, регулярными нарушениями температурного режима в анамнезе и гистологически подтверждённой НОА составило 28. При этом гистологическая картина у этих пациентов была относительно благоприятной: преобладающим паттерном был гипосперматогенез, причём у трёх пациентов индекс Бергманна-Клиш составил 8-9, а НОА была установлена только в связи с наличием грубых атрофических изменений. У 16 пациентов была смешанная тестикулярная атрофия в разной степени (от 1 до 7 баллов), и у 6 показатель Бергманна-Клиш составил менее 1 балла. Лишь у двух пациентов по данным гистологического исследования отсутствовали вытянутые сперматиды в канальцах (у одного пациента 100% СКС, у второго – 70% СКС и 30% АС на этапе круглых сперматид). Учитывая

относительно благоприятный морфологический профиль этих пациентов, сперматозоиды были получены в 19 случаях (70.4%).

Таблица 7 – Результаты логистического регрессионного анализа факторов, указывающих на необструктивный характер азооспермии у пациентов с нормальными клинико-лабораторными показателями

<i>Предикторы НОА</i>	<i>ОВ</i>	<i>95% ДИ</i>	<i>P</i>
Возраст (на 1 год)	0.998	0.958–1.039	0.907
Варикоцеле	0.769	0.382–1.546	0.461
Нарушения температурного режима	1.989	1.101–3.595	0.023
Табакокурение	0.885	0.497–1.575	0.678
Уровень прогестерона (на 1 нмоль/л)	0.858	0.646–1.140	0.290
Уровень пролактина (на 1 мкМЕ/мл)	0.999	0.997–1.001	0.193
Уровень эстрадиола (на 1 пмоль/л)	1.003	0.997–1.009	0.295
Паховое грыжесечение в анамнезе	0.983	0.248–3.899	0.981
Гидроцелэктомия в анамнезе	0.775	0.055–10.986	0.850
Варикоцелэктомия в анамнезе	2.447	0.794–7.545	0.119
Орхипексия в анамнезе	1.668	0.223–12.473	0.618
Травма мошонки в анамнезе	0.572	0.225–1.456	0.242
Химиолучевая терапия в анамнезе	>9999	0.000–>9999	1.000

Анализ с помощью дерева решений показал, что вероятность ошибочного определения вида азооспермии была максимальной (82.6%) в категории пациентов с уровнем ингибина В ниже 93 пг/мл, хотя установленным нижним порогом нормы является значение 25 пг/мл (рисунок 11).

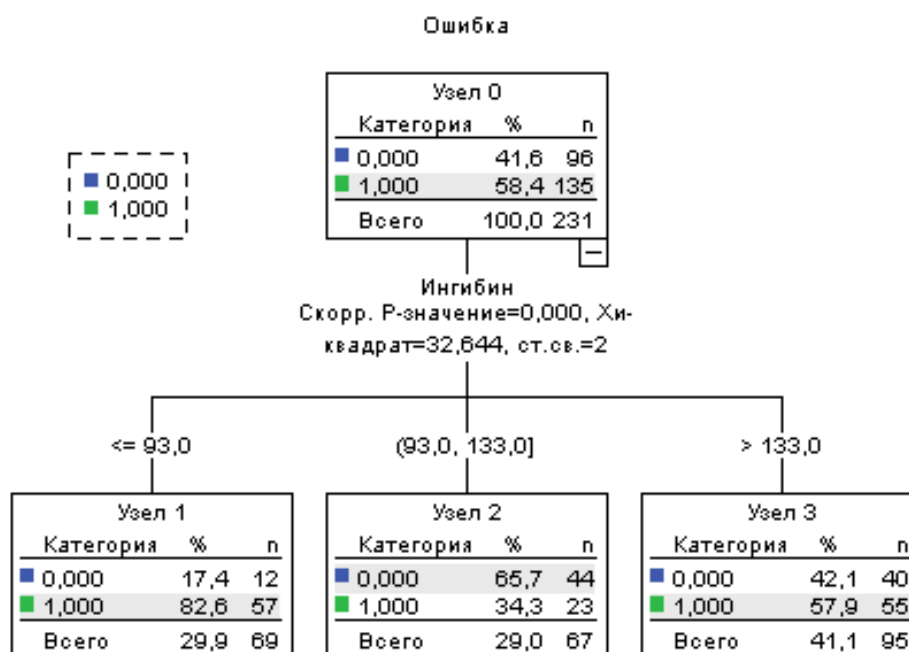


Рисунок 11 – Древо классификации для определения групп пациентов, у которых возможно ошибочное определение вида азооспермии

3.6 Сравнительная оценка качества тестикулярных и эпидидимальных сперматозоидов у пациентов с обструктивной азооспермией

Для оценки качества сперматозоидов у пациентов с ОА мы применяли анализ на фрагментацию ДНК (методика TUNEL). Лишь у 45 пациентов было получено достаточно материала как из яичка, так и из его придатка, чтобы можно было провести адекватный сравнительный анализ по индексу фрагментации ДНК сперматозоидов.

Тест Колмогорова-Смирнова по 90 значениям показал, что данные были распределены ненормально, поэтому сравнивались медианы значений индекса фрагментации ДНК с помощью U-теста Манна-Уитни.

Медиана индекса фрагментации ДНК эпидидимальных сперматозоидов составила 28.5% (диапазон: 18.1–46.5; МКР: 26.1–32.7), тестикулярных

сперматозоидов – 15.9% (диапазон: 7.6–22.6; МКР: 13.5–20.1). Разница оказалась статистически значимой ($p = 0.0004$). Сравнение частоты наступления беременности и ЧРД провести не удалось, учитывая малый объём наблюдений и то, что у каждой конкретной пары применялись либо сперматозоиды из яичка, либо из придатка, что делало невозможным прямой сравнительный анализ.

3.7 Анализ генетических причин бесплодия у пациентов с азооспермией

ЧПС у пациентов с синдромом Кляйнфельтера 47,XXY оказалась в нашей выборке низкой – сперматозоиды были получены в 2 случаях из 27 (7.4%). У одного пациента родился здоровый ребёнок после ICSI с преимплантационной генетической диагностикой. Следует отметить, что никому из этих пациентов не выполнялась вторая попытка биопсии яичка. Низкая ЧПС в нашей выборке может объясняться относительно высоким средним возрастом пациентов (≈ 30 лет) и тем, что значительная доля из них до обращения к нам получала тестостерон-заместительную терапию (55.5%).

При наличии мутаций CFTR сперматозоиды были получены у 10 из 13 пациентов (76.9%). У всех трёх пациентов с неудачами биопсии яичка при мутациях CFTR был гипергонадотропный гипогонадизм, что свидетельствовало о нарушенном сперматогенезе; у одного из них мутации CFTR сопутствовали делеции региона AZFb, ещё у одного – делеции региона AZFc.

Из 17 пациентов с изолированными хромосомными аномалиями без каких-либо других генетических нарушений сперматозоиды были получены лишь у двоих (11.7%), и в одной из пар удалось добиться рождения ребёнка в результате ICSI. У пациентов с мутациями AZFc (без поражения регионов AZFa и AZFb) удалось получить сперматозоиды в 5 случаях из 31 (16.1%), хотя ни в одной паре на момент выполнения анализа не удалось добиться рождения ребёнка. Никому из этих пациентов повторные попытки получения сперматозоидов не выполнялись.

Мы провели логистический регрессионный анализ факторов, которые могли бы указывать на вероятное наличие генетических причин бесплодия у мужчин с азооспермией. Результаты анализа представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты логистического регрессионного анализа факторов, указывающих на вероятное наличие генетических нарушений у мужчин с азооспермией

<i>Предикторы генетических нарушений</i>	<i>ОВ</i>	<i>95% ДИ</i>	<i>P</i>
Возраст (на 1 год)	0.884	0.843–0.928	< 0.001
Уровень ингибина В (на 1 пг/мл)	0.999	0.994–1.003	0.587
Уровень ФСГ (на 1 мМЕ/мл)	1.031	1.009–1.054	0.007
Уровень ЛГ (на 1 мМЕ/мл)	0.967	0.941–0.994	0.016
Уровень тестостерона (на 1 нмоль/л)	0.978	0.944–1.014	0.236
Уровень прогестерона (на 1 нмоль/л)	0.919	0.731–1.157	0.473
Уровень пролактина (на 1 мкМЕ/мл)	1.001	1.000–1.003	0.046
Уровень эстрадиола (на 1 пмоль/л)	0.992	0.988–0.997	0.002
Суммарный объём яичек (на 1 см ³)	0.979	0.949–1.010	0.184
Орхипексия в анамнезе	0.542	0.154–1.917	0.342
Травма мошонки в анамнезе	0.711	0.241–2.100	0.537
Химиолучевая терапия в анамнезе	0.000	0.000–>9999	0.999

Отрицательными предикторами наличия генетических нарушений у мужчин с азооспермией являются возраст (ОВ = 0.884; 95% ДИ = 0.843–0.928), уровень ЛГ (ОВ = 0.967; 95% ДИ = 0.941–0.994), уровень эстрадиола (ОВ = 0.992; 95% ДИ = 0.988–0.997), а положительными предикторами являются уровень ФСГ (ОВ =

1.031; 95% ДИ = 1.009–1.054) и уровень пролактина (ОВ = 1.001; 95% ДИ = 1.000–1.003).

Для выделения категорий пациентов с азооспермией с различной вероятностью выявления генетических нарушений нами было построено древо классификации, изображённое на рисунке 7.

Нам удалось установить, что максимальная вероятность наличия генетических нарушений отмечается у молодых мужчин до 30 лет с уровнем ФСГ более 5.5 мМЕ/мл. В этой категории генетические аномалии были обнаружены практически у каждого четвёртого пациента (25.3%). Напротив, у мужчин старше 39 лет, обратившихся по поводу бесплодного брака и азооспермии, мы не обнаружили ни одного случая нарушений кариотипа, мутаций региона AZF и генов CFTR. Также вероятность обнаружения генетических аномалий составляла менее 10% у мужчин младше 30 лет с уровнем ФСГ до 5.5 мМЕ/мл и у мужчин в возрасте от 30 до 39 лет с уровнем ФСГ до 19.7 мМЕ/мл.

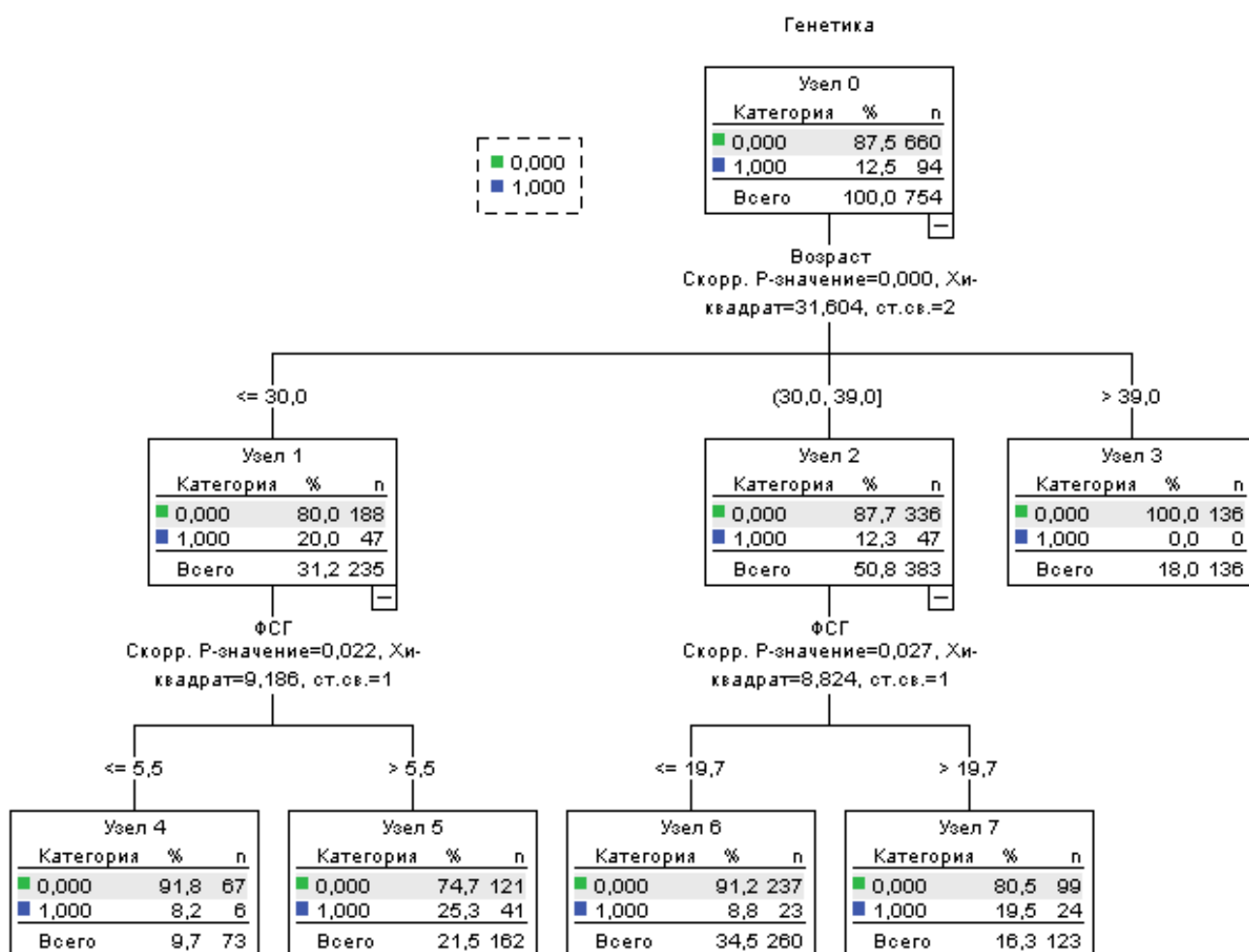


Рисунок 12 – Древо классификации для определения групп пациентов с различной вероятностью обнаружения генетических аномалий

3.8 Оценка влияния варикоцеле на репродуктивные исходы в парах с азооспермией

Для оценки влияния варикоцеле на репродуктивные исходы мы сопоставили ЧПС, ЧРД и количество циклов ICSI, потребовавшихся для рождения ребёнка, у пациентов с подтверждённым варикоцеле на момент выполнения биопсии яичка и у пациентов без варикоцеле (таблица 9). Всего в выборке было 203 пациента с варикоцеле (группа 1) и 504 пациента без варикоцеле (группа 2). Попытки ICSI

после хирургического получения сперматозоидов проводились в 73 и 186 парах соответственно.

Таблица 9 – Репродуктивные результаты после попыток хирургического получения сперматозоидов в зависимости от наличия или отсутствия варикоцеле

<i>Репродуктивные результаты</i>	<i>Группа 1</i>	<i>Группа 2</i>	<i>P</i>
Частота получения сперматозоидов	38.9% (n = 79)	41.7% (n = 210)	0.5
Частота рождения детей	52% (n = 38)	47% (n = 86)	0.771
Количество циклов на 1 рождение	3 [0]	2 [2]	<0.00001

Наличие варикоцеле не сказывалось на ЧПС и ЧРД, хотя статистически значимо влияло на количество циклов ICSI, потребовавшихся для рождения одного ребёнка.

Чтобы оценить возможное влияние хирургического лечения варикоцеле на репродуктивные результаты, мы сравнили те же самые параметры у пациентов с варикоцеле (группа 1, n = 203) и у пациентов, которым в прошлом была выполнена варикоцелэктомия (группа 2, n = 89). У 30 пар, к которым принадлежали пациенты из группы 2, применялись попытки хирургического получения сперматозоидов. Результаты сравнения представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Репродуктивные результаты после биопсии яичка у пациентов с варикоцеле и пациентов, перенесших варикоцелэктомию

<i>Репродуктивные результаты</i>	<i>Группа 1</i>	<i>Группа 2</i>	<i>P</i>
Частота получения сперматозоидов	38.9% (n = 79)	38.2% (n = 34)	0.908
Частота рождения детей	52% (n = 38)	46.7% (n = 14)	0.771
Количество циклов на 1 рождение	3 [0]	1 [2]	0.00072

Хирургическое лечение варикоцеле статистически значимо снижало количество попыток ICSI с использованием хирургически полученных сперматозоидов, которые потребовались для рождения ребёнка в парах с азооспермией.

3.9 Анализ эффективности повторных биопсий яичка

В нашу выборку вошло 59 пациентов, которым выполнялись повторные биопсии яичка. Из них 55 пациентам выполнено 2 попытки хирургического получения сперматозоидов, и ещё 4 пациентам выполнено 3 попытки хирургического получения сперматозоидов. При этом во избежание искажения результатов мы учитывали только те попытки биопсии, которые выполнялись в нашем центре.

Тринадцать пациентов из этих 59 имели ОА и каждая попытка хирургического получения сперматозоидов у них была удачной. Повторные биопсии (PESA / TESA или MESA / TESE) выполнялись у них с целью использования нативного не подвергнутого криоконсервации биоматериала в протоколе BPT (fresh-биопсии). Далее эти пациенты обсуждаться не будут.

Что касается пациентов с НОА, то у них при повторных попытках сперматозоиды были получены в 20 случаях (43.5%). Проводить регрессионный анализ здесь было бы нецелесообразно, учитывая малый объём наблюдений. Тем не менее, нам удалось сопоставить результаты повторной биопсии с гистологическим заключением по материалу, полученному во время первого вмешательства. Данные результаты представлены в таблице 11.

Общая ЧПС при повторных попытках получения сперматозоидов составила 52.2%. К рождению ребёнка в результате ICSI привели 23.9% повторных биопсий. Наиболее благоприятные результаты наблюдались у пациентов, у которых при гистологическом исследовании после первой биопсии был подтверждён гипосперматогенез. При остановке созревания сперматозоидов на различных стадиях результаты были несколько хуже, хотя даже при такой гистологической

картине удавалось получить сперматозоиды и в единичных случаях добиться рождения детей. Интересно, что при microTESE сперматозоиды было возможно получить даже при СКС по данным первичной биопсии в 4 из 12 случаев, хотя ни разу это не привело к рождению ребёнка.

Таблица 11 – Результаты повторных попыток хирургического получения сперматозоидов при НОА

<i>Первичная гистология</i>	<i>Общее количество</i>	<i>Получение сперматозоидов</i>	<i>Рождение детей</i>
Гипосперматогенез	24	16 (66.7%)	9 (37.5%)
Остановка созревания на этапе вытянутых сперматид	5	2 (40%)	1 (20%)
Остановка созревания на этапе круглых сперматид	5	2 (40%)	1 (20%)
Сертоликлеточный синдром	12	4 (33.3%)	0
<i>Всего</i>	46	24 (52.2%)	11 (23.9%)

Также мы отдельно оценили вероятность успешного репродуктивного исхода в зависимости от процентных показателей сохранённого сперматогенеза по данным первичного гистологического исследования. Результаты представлены в таблице 12. Пациенты с индексом Бергманна-Клиш от 8 до 10 в таблице 12 не представлены, так как ни одному из таких пациентов повторная биопсия яичка не выполнялась: в большинстве случаев первая попытка была удачной и повторная биопсия не требовалась, а в отдельных ситуациях пациенты сами отказывались или откладывали вмешательство на неопределённый срок. Даже при тотальном СКС с индексом Бергманна-Клиш, равным 0, сперматозоиды были получены в двух случаях, что говорит о полиморфности гистологической картины при НОА.

При НОА трём пациентам с гипосперматогенезом выполнялась третья биопсия после двух неудачных попыток. В одном случае были получены сперматозоиды, хотя у этой пары так и не удалось добиться рождения ребёнка.

Таблица 12 – Результаты повторных попыток хирургического получения сперматозоидов при НОА в зависимости от индекса Бергманна-Клиш

<i>Индекс Бергманна-Клиш</i>	<i>Общее количество</i>	<i>Получение сперматозоидов</i>	<i>Рождение детей</i>
8–10	0	–	–
1–7	28	17 (60.7%)	9 (32.1%)
0.1–0.9	10	5 (50%)	2 (20%)
0	8	2 (25%)	0
<i>Всего</i>	46	24 (52.2%)	11 (23.9%)

3.10 Осложнения биопсии яичка

Нами зафиксировано небольшое число осложнений биопсии яичка. Структура осложнений представлена в таблице 13. Учитывая малое количество осложнений, регрессионный анализ предикторов их развития не выполнялся.

В 15 случаях у пациентов в ближайшем послеоперационном периоде развилась острая задержка мочи, что с наибольшей вероятностью связано с последствиями спинальной анестезии. У 3 из этих пациентов дальнейшее течение послеоперационного периода осложнилось развитием орхита и эпидидимита, и ещё у 1 пациента развилась инфекция мочевых путей, по поводу чего им была назначена антибактериальная терапия.

В 10 случаях развилась гематома мошонки, которая потребовала проведения хирургической ревизии. Ни в одной ситуации ревизия не привела к обнаружению

кровоотокающего сосуда, который мог бы быть причиной образования гематомы. В 8 случаях из 10 пациенту выполнялась мультифокальная TESE, и лишь в 2 случаях - microTESE. В одном случае пациенту, перенесшему мультифокальную TESE, в хирургическом отделении по месту жительства была выполнена орхэктомия.

У 47 исходно эугонадных пациентов через 1 месяц после операции было зафиксировано снижение уровня тестостерона, которое оказалось транзиторным. Во всех случаях уровень тестостерона сыворотки крови восстановился через 6 месяцев. Никому из пациентов с исходно нормальным уровнем тестостерона заместительная гормональная терапия не потребовалась.

Таблица 13 – Осложнения биопсии яичка

<i>Группа по Клавьену-Диндо</i>	<i>Осложнение</i>	<i>n (%)</i>
I	Подкожная гематома	32 (4.5%)
II	Орхит, эпидидимит	3 (0.4%)
	Инфекция мочевыводящих путей	1 (0.1%)
	Раневая инфекция	2 (0.3%)
IIIa	Острая задержка мочи в ближайшем послеоперационном периоде	15 (2.1%)
IIIb	Гематома мошонки, потребовавшая хирургической ревизии	9 (1.3%)
IIIbd	Гематома мошонки, потребовавшая хирургической ревизии и завершившаяся орхэктомией	1 (0.1%)

3.11 Клинический пример

Пациент А., 37 лет, обратился в отделение андрологии и урологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации с целью достижения беременности в рамках протокола ВРТ. Пара ведет половую жизнь без контрацепции на протяжении 10 лет. За это время у супруги пациента не было ни одной беременности.

В анамнезе 2 открытые биопсии яичек (TESE) по месту жительства в другом учреждении в 2008 и 2009 гг., по результатам которого сперматозоиды не обнаружены.

Гистологическое исследование биоптатов не выполнялась.

В семье по мужской линии проблем с фертильностью не отмечал.

Со слов пациента, в анамнезе тупая травма мошонки в возрасте 12 лет, а в 27 лет перенес острый орхэпидидимит слева.

Из анамнеза также известно: профессиональные вредные факторы, воздействие токсических химических веществ, ионизирующего излучения отрицает. Вредные привычки – курение 30 сигарет в сутки. Дебют половой жизни с 17 лет. Эректильная функция сохранна, половая конституция низкая, либидо сохранно, половые контакты регулярные 1-3 раза в неделю, утренние эрекции отсутствуют, отмечает некоторое снижение твердости эрекции, нестабильность эрекции в ходе полового акта.

Данные объективного осмотра: Кожные покровы нормальной окраски, чистые, подкожно-жировая клетчатка развита избыточно, скелет сформирован по мужскому типу, оволосение по мужскому типу, на лице – скудное оволосение.

Наружные половые органы сформированы правильно. Головка полового члена обнажается свободно. Слизистая головки и внутреннего листка крайней плоти бледно-розовые, патологические выделения из уретры отсутствуют.

Кавернозные тела полового члена симметричные, безболезненные при пальпации. Мошонка сформирована правильно. Яички пальпируются в мошонке, уменьшены, тестоватой консистенции, правильной формы, безболезненны при пальпации, мобильность в пределах нормы. Придатки не увеличены, безболезненны при пальпации. Семенные канатики не утолщены, без патологических включений. Вены лозовидного сплетения визуально определяются, при пальпации расширены. Проба Вальсальвы положительная с обеих сторон.

PR: Предстательная железа расположена типично, не увеличена, плотно-эластической консистенции, гладкая, доли ровные, симметричные, края четкие, срединная бороздка определяется, слизистая подвижная, узловые образования не определяются.

Степень развития первичных и вторичных половых признаков соответствует II по Таннеру.

Вес 85 кг, рост 185 см, ИМТ – 25, что соответствует норме.

По результатам дообследования:

В спермограмме неоднократно - азооспермия.

Гормональный профиль: ФСГ-15,6 МЕ/л (1,2-11,7), ЛГ-9,8 МЕ/л (2,5-10), Т-11,5 нмоль/л (12-33 нмоль/л), Ингибин Б - 14 пг/мл (25-325).

Генетика: Кариотип: 46 XY.

Микроделеции AZF-региона Y хромосомы - не обнаружены,

Мутации гена муковисцидоза CFTR – не обнаружено.

УЗИ, УЗДГ органов мошонки: V(TD)=6,5 см³, V(TS)=4,5 см³, паренхима эхонеоднородна, за счет единичных очаговых гиперэхогенных включений придатки не утолщены, неоднородны. Вены гроздьевидного сплетения расширены с 2-х сторон до 3,2 и 3,6 мм. На высоте пробы Вальсальвы определяется патологический рефлюкс по левой и правой яичковым венам со скоростью более 8 см/с, продолжительностью более 3 с.

Предварительный клинический диагноз: Бесплодие I. Необструктивная азооспермия. Двухстороннее варикоцеле II ст., I гемодинамический тип. Гипотрофия яичек. Гипергонадотропный гипогонадизм. Хронический простатит, двухсторонний хронический эпидидимит, ст. ремиссии. Состояние после биопсии яичек (2008,2009 гг)

Рекомендованы модификация образа жизни, отказ от курения, дообследование.

Учитывая течение заболевания, отсутствие изменений в серии спермограмм, больному было предложено проведение микрохирургической субингвинальной варикоцелэктомии по Мармару с 2-х сторон с последующей лекарственной стимуляцией с целью: восстановления сперматогенеза, профилактики дальнейшей гипотрофии яичек, коррекции гипогонадизма, улучшения результатов программ ВРТ.

Вторым этапом при отсутствии в эякуляте через 3-6 месяцев пригодных сперматозоидов планируется проведение фреш-биопсии яичек, придатков (MESA, microTESE) в день пункции супруги в программе ВРТ с целью получения сперматозоидов для ЭКО/ИКСИ.

Однако пациент от предложенного лечения отказался.

Супруга осмотрена гинекологом, дообследована – противопоказаний для вступления в программу ВРТ нет.

Пациенту была выполнена операция: Открытая мультифокальная биопсия яичек, придатков (MESA, TESE) с 2х сторон.

Ранний послеоперационный период протекал без осложнений, пациент активизирован в первые часы, рана без признаков диастаза, швы состоятельные. Выполнено УЗИ органов мошонки – признаков продолжающегося кровотечения нет. Осложнений в отдаленном послеоперационном периоде не было, заживление первичное, болевой синдром минимальной степени выраженности в первые дни после операции – купирован консервативно приемом НПВП. Швы удалены на 7-е сутки.

Эмбриологическое заключение: сперматозоиды не обнаружены.

Гистологическое заключение: в единичных канальцах сперматогенез до стадии вытянутых сперматид.

Учитывая неудачную биопсия яичка пациент дал согласие на проведение микрохирургической субингвинальной варикоцелэктомии по Мармару с 2-х сторон.

Через 3 мес. после микрохирургической варикоцелэктомии была проведена гормональная терапия с препаратами хорионического гонадотропина в дозе 5000 МЕ через 2 дня в течение 3-х месяцев.

Через 6 месяцев после варикоцелэктомии пациенту была выполнена микрохирургическая биопсия яичка справа – microTESE.

Эмбриологическое заключение: Единичные живые подвижные сперматозоиды (категории В). Произведена криоконсервация.

Гистологическое заключение: В 90% - созревание до уровня незрелых сперматид. В 10% - половые клетки на всех этапах развития. Выраженный гипосперматогенез. Супруга пациента была подготовлена для проведения программы ВРТ (ИКСИ в программе ЭКО).

При трансвагинальной пункции получено 8 ооцит-кумулюсных комплексов, после денудации 5 ооцитов оказались на стадии МП и были пригодны для дальнейшего оплодотворения. Произведено ИКСИ, в результате чего получено 5 зигот. На 5-е сутки культивирования был перенесен один эмбрион на стадии бластоцисты класса 4АА согласно классификации Д. Гарднера. Два эмбриона криоконсервированы на стадии бластоцисты класса 3АА и 4ВВ. Остальные 2 эмбриона утилизированы в связи с качеством, не соответствующим условиям криоконсервации (4СС, 4СС, 12b, АTR). Наступила клиническая беременность, протекавшая без особенностей и завершившаяся срочными родами оперативным путем, извлечена живая доношенная девочка с массой тела 3240 г., длиной 51 см, 8/9 баллов по шкале Апгар. Операция кесарева сечения выполнена по медицинским показаниям.

Пациент повторно обратился через 3 года в связи с отсутствием криоконсервированного материала для проведения microTESE.

Без предварительной гормональной подготовки выполнена операция: открытая микрохирургическая биопсия яичек (microTESE) с 2-х сторон (5-я биопсия яичка)

Эмбриологическое заключение: слабоподвижные сперматозоиды в количестве пригодном для криоконсервации (2 порции).

Гистологическое заключение: в 100% канальцев – клетки герминогенного эпителия в уменьшенном количестве, 60-70% - сперматогенез до вытянутых сперматид. Двухсторонняя смешанная атрофия герминогенного эпителия, гипосперматогенез. Планируется проведение программы ВРТ.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

ЧПС в нашей выборке в условиях активного применения микрохирургических методик MESA и microTESE составила 40.9%. ЧПС при ОА была равна 100%, что соответствует литературным данным; при НОА этот показатель был значительно ниже и составил 31.1% [34]. В работе Okada et al. ЧПС при НОА была равна 44.6% [151]. В выборке Ramasamy et al. сперматозоиды были получены в 57% случаев [165]. Систематический обзор Deruyver et al. указывает, что этот показатель колеблется от 42.9% до 63% [73]. Результаты Bonarriba et al. значительно ближе к нашим: они указывают на ЧПС 100% при ОА и 36% при НОА [58]. Однако, сравнение нашего результата с данными других авторов вызывает затруднения сразу по нескольким причинам. Во-первых, в разных работах отмечается гетерогенность показаний к выполнению microTESE, и в некоторых из них в анализ включались даже пациенты с криптозооспермией. Во-вторых, не всегда понятна методология определения вида азооспермии (ОА или НОА), а именно, ориентировались ли авторы на гистологические или только на клинические параметры при разделении пациентов по этому признаку. В нашей работе мы ориентировались именно на гистологическую картину, причём оказалось, что 60.6% пациентов с нормальным объёмом яичек и эндокринными показателями всё-таки имеют НОА, если ориентироваться на данные морфологических исследований. Действительно, в работе Enatsu et al., где авторы ориентировались на гистологический результат, ЧПС при НОА составила 29.5% [78]. В-третьих, под успешным получением сперматозоидов мы понимали не получение сперматозоидов *per se*, а именно ситуацию, когда половые клетки были получены в достаточном количестве и были пригодны для криоконсервации и / или ICSI. К сожалению, не во всех исследованиях подробно описывается, что именно авторы понимали под успехом microTESE. В-четвёртых, мы исключили фактор направленного отбора пациентов и проводили биопсии придатков и яичек по стандартному алгоритму (рисунок 5) всем мужчинам с азооспермией даже при

минимальной прогнозируемой вероятности получения сперматозоидов, если мужчина давал информированное согласие. В нашу выборку даже вошли несколько мужчин с мутациями в регионе AZFb Y-хромосомы, которые были предупреждены об отсутствии эффективности биопсии яичка, но были настроены на использование любых шансов для достижения биологического отцовства и настояли на проведении процедуры.

Как и другие исследователи, мы установили, что уровень ФСГ и объём яичек являются значимыми предикторами получения сперматозоидов: ФСГ является отрицательным предиктором, а объём яичек – положительным [45, 116]. Однако, наши результаты не подтверждают того, что ЛГ может служить самостоятельным прогностическим фактором в отношении вероятности получения сперматозоидов. Напротив, мы установили, что эугонадные пациенты с изолированным повышением уровня ФСГ на фоне нормального уровня ЛГ имеют критически низкую вероятность получения половых клеток при биопсии [11, 172]. Этот феномен был упомянут Esteves в одной из практически ориентированных статей, но не был последовательно описан в научной литературе [80]. При добавлении изолированного повышения ФСГ в регрессионную модель данная переменная оказалась статистически значимой, а номинальный уровень ФСГ, наоборот, потерял значимость. Этим же феноменом объясняется то, что в нашем исследовании уровень тестостерона оказался отрицательным предиктором вероятности получения сперматозоидов. Сто сорок пять пациентов, которые составили 27.1% от всех больных с НОА, имели эугонадный статус при изолированно высоком уровне ФСГ, что объясняет данный, казалось бы, парадоксальный результат статистического анализа. При грубом диффузном поражении тестикулярной паренхимы из-за равномерного нарушения функции герминогенного эпителия и клеток Лейдига происходит значительное повышение секреции ФСГ и ЛГ соответственно. В таких случаях можно ожидать наличия очагов с сохранённым сперматогенезом, которые, как правило, можно идентифицировать при microTESE, получая при этом положительный

репродуктивный результат. Такая же ситуация отмечается при синдроме Кляйнфельтера, особенно при его мозаичных вариантах. Однако, когда задействованы более тонкие патогенетические механизмы нарушения сперматогенеза, такие как генетически детерминированный арест сперматогенеза на поздних стадиях или селективная гибель герминального эпителия при интактности остальных структур яичка, включая клетки Лейдига в интерстиции, следует ожидать изолированного повышения уровня ФСГ. При этом повышение оказывается обманчиво умеренным, в большинстве случаев не достигая 20 мМЕ/мл. Результаты биопсии яичка у этой группы пациентов являются, вопреки ожиданиям, неблагоприятными, так как фокальный сперматогенез у них, как правило, отсутствует. Возможно, этим пациентам в будущем удастся помочь с помощью клеточных технологий или методики интрацитоплазматической инъекции круглых сперматид [13,14, 211].

Вероятно, этим же объясняется низкая диагностическая ценность биохимических маркеров сохранности сперматогенеза. Обратная линейная зависимость между уровнем ФСГ и вероятностью обнаружения сперматозоидов является весьма слабой. То же самое касается прямой линейной зависимости с уровнем ингибина В. В лучшем случае, эти параметры позволяют грубо сформулировать репродуктивный прогноз в рутинной клинической практике. Однако, следует отметить, что наш ROC-анализ продемонстрировал ощутимо более высокие показатели AUC для ФСГ и ингибина В (0.726 и 0.812), чем в исследовании Verza и Esteves [218]. Так же как и Güneri et al., мы обнаружили минимальную ЧПС при умеренном повышении уровня ФСГ: в цитируемой работе описан интервал от 10 до 30 мМЕ/мл, тогда как нам с помощью анализа древа классификации удалось более точно выделить группу пациентов с уровнем ФСГ от 15.1 до 19.7 мМЕ/мл при низких показателях концентрации ингибина В [102]. Возможно, гиперпродукция ФСГ при НОА обладает определённым положительным влиянием и позволяет поддерживать жизнеспособность единичных очагов сперматогенеза. Однако, если это действительно так, то

появление и закрепление этого компенсаторного механизма трудно объяснить с позиций эволюционной биологии, так как самцы млекопитающих с азооспермией даже на фоне гиперпродукции ФСГ при очаговом сперматогенезе навряд ли могли бы дать потомство. Поэтому более вероятно, что наблюдаемый «провал» в ЧПС у пациентов со слабым повышением уровня ФСГ всё же связан с наличием разных фенотипов НОА, которые описаны выше.

Регрессионный анализ продемонстрировал, что у пациентов, перенесших в детстве орхипексию по поводу крипторхизма, вероятность получения сперматозоидов была практически в 3 раза выше, чем у остальных. Интерпретировать этот результат следует с осторожностью. Это лишь означает, что крипторхизм по сравнению с более «тяжёлыми» причинами НОА, которые встречались у других пациентов (например, мутации AZFc, хромосомные аномалии, химиотерапия и др.), характеризовался более благоприятным профилем репродуктивных результатов. Существенное ограничение нашего анализа заключается в том, что мы не могли оценивать возраст, в котором происходила орхипексия. Для полноценного изучения этого фактора требуется проведение ретроспективных когортных исследований или исследований «случай-контроль» с включением, в том числе, и мужчин без азооспермии. Проспективные исследования в этом направлении невозможны, так как действующие клинические рекомендации по детской урологии призывают выполнять орхипексию в раннем возрасте. Ни один из других этиологических факторов азооспермии не был значимым предиктором ЧПС по данным логистического анализа. К похожему результату пришли Esteves et al., сделавшие вывод о том, что этиология НОА не оказывает значимого влияния на ЧПС [86].

Нам не удалось обнаружить самостоятельных предикторов эффективности PESA / TESA помимо объёма яичек и уровня ингибина В. Таким образом, пункционные методики получения сперматозоидов можно рекомендовать только пациентам с ОА, причём в относительно простых клинических случаях [36].

На ЧРД в парах, где у мужчины наблюдалась азооспермия, влияли только женские факторы, а именно возраст женщины и наличие гинекологических заболеваний. В том случае, если удавалось получить достаточное количество сперматозоидов удовлетворительного качества, эффективность ICSI практически не зависела от изучаемых андрологических факторов, в том числе от этиологии азооспермии.

Почти 45% пациентов в нашей выборке имели синдром клеток Сертоли по данным гистологического исследования тестикулярной паренхимы. Реже отмечались арест созревания и гипосперматогенез. У Bonarriba et al. (Испания) СКС был отмечен у 41% пациентов, АС – у 26.2%, гипосперматогенез – у 32.8%, что практически совпадает с нашими результатами [58]. У Salehi et al. (Иран) доля СКС, АС и гипосперматогенеза составила 43.5%, 27.1% и 29.4% соответственно [172]. Данные японских авторов существенно отличаются от вышеозначенных. В работе Enatsu et al., для сравнения, СКС наблюдался у 74.8% пациентов [78]. В выборке Ishikawa et al. СКС, АС и гипосперматогенез наблюдались у 72%, 10.7% и 17.3% пациентов соответственно [117]. Аналогичная пропорция наблюдается у Tsujimura et al.: 71.4%, 7.4% и 21.2% соответственно [197]. Возможно, это связано с особенностями методологии обработки и гистологического исследования биоптатов. Другим объяснением наблюдаемого диссонанса служит расовая однородность и относительная генетическая изолированность популяции японских исследований, в которой могут с другой частотой наблюдаться разные фенотипы НОА. Следует отметить, что гистологическая картина тестикулярной паренхимы при НОА крайне редко является однородной: на фоне СКС могут встречаться каналцы с АС на разных этапах, а иногда и единичные каналцы с полноценным сперматогенезом. К сожалению, этот момент учитывается далеко не во всех научных работах и это мешает адекватному сопоставлению данных. Существуют и стандартизованные системы описания гистологической картины, например, система градации сперматогенеза по Джонсену, но они имеют свои недостатки и принимаются далеко не всеми урологами-андрологами и патоморфологами [221].

Ещё одним спорным вопросом в ведении пациентов с азооспермией является дифференциальная диагностика между ОА и НОА [40]. Эта задача не так уж проста, несмотря на то, что в литературе описаны «типичные» признаки НОА. В нашем исследовании 60.6% пациентов с исходно нормальными уровнями половых гормонов и объёмом яичек имели признаки НОА по данным гистологического исследования. Подобное расхождение клинического и морфологически подтверждённого диагнозов не описывается в большинстве работ, посвящённых азооспермии, что также мешает сопоставлять их результаты между собой. Некоторыми причинами наличия НОА у таких пациентов могут быть известная вариативность физиологии гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, несовершенство принятых на сегодняшний день референсных значений для гонадотропинов и ингибина В, а также повреждение семенных канальцев на фоне длительно существующей обструкции. Следует отметить, что у большинства подобных пациентов в нашей выборке отмечались относительно мягкие формы нарушения сперматогенеза: лишь у 17 пациентов из 131 при гистологическом исследовании выявлены признаки СКС. Регрессионный анализ показал, что регулярное нарушение температурного режима было значимым предиктором наличия НОА на фоне нормальных клинико-лабораторных параметров. Из этого нельзя с уверенностью сделать вывод, что перегрев органов мошонки является самостоятельной причиной развития азооспермии. Вероятно, у части подобных пациентов сперматогенез был исходно скомпрометирован, а нарушения температурного режима лишь усугубили их и привели к азооспермии с относительно лёгкими формами повреждения герминального эпителия. Интересно, что анализ с помощью построения древа классификации продемонстрировал высокую вероятность ошибочного определения формы азооспермии при уровне ингибина В до 93 пг/мл (при норме от 25 пг/мл). Данное наблюдение может свидетельствовать о том, что существующие референсные значения для этого анализа, который исходно применялся у мужчин как маркер гранулёзочлеточных опухолей яичка, не соответствуют задачам андрологической практики, в которой

он рассматривается как маркер активности сперматогенеза. Наконец, можно утверждать, что одним из ключевых признаков, позволяющих различить ОА и НОА, является наличие анамнестических сведений, указывающих на возможную этиологию обструкции. Ни у одного из пациентов, у которых была НОА при нормальных клиничко-лабораторных показателях, не было ни одного фактора риска обструкции семенных путей (операции, воспалительные процессы, врождённое двустороннее отсутствие семявыносящих протоков и т.д.).

Неоднозначен вопрос об использовании тестикулярных или эпидидимальных сперматозоидов при истинной ОА. У здоровых мужчин наилучшим качеством обладают сперматозоиды из эякулята, которые должным образом прошли все этапы созревания и готовы к оплодотворению в рамках естественного цикла. Однако, при обструкции семявыносящих путей и некоторых других состояниях созревание сперматозоидов происходит в заведомо патологических условиях, что наводит на мысль о возможных преимуществах использования тестикулярных сперматозоидов ОА. В нашем исследовании удалось подтвердить, что сперматозоиды из яичка имеют статистически значимо более низкие показатели фрагментации ДНК. Для того, чтобы понять, насколько это влияет на реальные показатели частоты наступления беременности и рождения детей, требуется больше времени и внесение определённых изменений в дизайн исследования. Тем не менее, предварительно можно сделать вывод о том, что при ОА для ICSI лучше использовать тестикулярные сперматозоиды, не ограничиваясь применением методик PESA или MESA.

Как и ожидалось, мутации AZF-региона Y-хромосомы, как и другие генетические причины азооспермии, сопровождались относительно низкими ЧПС и ЧРД. Регрессионный анализ показал, что генетически обусловленная азооспермия может характеризоваться определёнными гормональными паттернами. Кроме того, была выявлена отрицательная связь между возрастом пациента и вероятностью положительного результата генетического скрининга (AZF, CFTR, кариотип). Разумеется, эта связь не является причинно-следственной

и обусловлена лишь тем, что генетические нарушения (например, синдром Кляйнфельтера) обычно проявляются клинически уже в молодом возрасте и становятся поводом для обращения за медицинской помощью. Кроме того, у пациентов старших возрастных групп чаще встречаются приобретённые причины азооспермии и вторичное бесплодие. Тем не менее, эта закономерность является полезной с практической точки зрения и позволяет определить категории пациентов, которые в первую очередь нуждаются в проведении генетического скрининга. Данный результат является ценным с практической точки зрения, так как высокая стоимость и сроки выполнения этих лабораторных исследований несколько ограничивают их применение в рутинной клинической практике.

Наличие варикоцеле на момент выполнения биопсии яичка в нашем исследовании не было ассоциировано с ЧПС [5]. На первый взгляд, это говорит о том, что варикоцеле не является клинически значимой находкой при азооспермии. Но с другой стороны, варикоцеле редко является основной причиной азооспермии и при этом не вызывает настолько грубое повреждение структуры сперматогенного эпителия, чтобы это могло значимо повлиять на результаты microTESE. Иными словами, неблагоприятное влияние варикоцеле на ЧПС в нашем исследовании могло быть компенсировано («замаскировано») активным применением микрохирургической техники.

Варикоцелэктомия также не приводила к повышению ЧПС по сравнению с пациентами, у которых на момент выполнения биопсии яичка было варикоцеле. При интерпретации данного результата следует помнить, что у определённой доли пациентов варикоцелэктомия позволяет восстановить сперматогенез и приводит к появлению сперматозоидов в эякуляте. Такие пациенты не соответствовали критериям включения нашего исследования, так как не имели показаний к хирургическому получению сперматозоидов, и в анализ не включались. Вероятно, азооспермия после варикоцелэктомии персистировала у тех пациентов, у которых варикоцеле исходно не было её основной причиной. Остальные причины НОА при этом сохранялись, что частично объясняет отсутствие разницы в ЧПС.

Haydardedeoglu et al. и Inci et al. приходили к противоположным результатам: в их работах ЧПС у мужчин после варикоцелэктомии была в 1.5–2.0 раза выше, чем у мужчин с варикоцеле [108, 115]. Наши данные в большей степени согласуются с результатами исследования Schlegel и Kauffman, у которых варикоцелэктомия не оказывала влияния на ЧПС [176].

Аналогичным образом варикоцеле и его хирургическое лечение не влияли на ЧРД. Тем не менее, наш анализ показал, в случае успешного хирургического получения сперматозоидов у пациента с азооспермией при наличии варикоцеле требуется больше циклов ICSI для рождения ребёнка (медиана: 3 против 2). У пар, где мужчина перенёс варикоцелэктомию с биопсией яичка в последующем, требовалось меньше циклов ICSI для рождения ребёнка (медиана: 1), чем в парах, где у мужчины было варикоцеле (медиана: 3). Данный результат может быть связан с негативным влиянием гемодинамических нарушений при варикоцеле на качество сперматозоидов, в том числе на целостность их ДНК. Обработка тестикулярных сперматозоидов, криоконсервация и оттаивание способны многократно усиливать эти повреждения. Тем не менее, учитывая отсутствие влияния варикоцеле на ЧРД в нашем исследовании и то, что варикоцеле не было самостоятельным прогностическим фактором в наших регрессионных моделях, интерпретировать этот результат нужно с осторожностью. Для его подтверждения требуется проведение проспективных исследований.

Нам удалось продемонстрировать умеренную эффективность повторных процедур microTESE при отрицательном результате первичной биопсии. Количество повторных попыток microTESE в нашей выборке не так уж велико, так как многие пациенты воспринимали первичный результат как окончательный и не соглашались на проведение повторных вмешательств, но даже такое количество случаев ($n = 46$) позволяет сделать некоторые предварительные выводы. У половины пациентов (52.2%) удалось получить сперматозоиды и у четверти (23.9%) – добиться рождения ребёнка. Наши данные согласуются с результатами Haimov-Kochman et al. и Yücel et al. [106, 221]. Ramasamy et al. сообщают о высокой

ЧПС (82%) при повторных microTESE, но здесь нужно заметить, что они включали в свою работу пациентов с успешной первой попыткой биопсии [178].

Наилучший прогноз в плане результативности повторной биопсии яичка был у пациентов с гипосперматогенезом по данным первичной биопсии, что соответствует находкам других авторов [104, 168]. Даже при СКС повторная microTESE оказывалась успешной в каждом третьем случае, хотя все попытки ICSI у этих пар пока были неудачными. Это говорит о том, что даже СКС нельзя рассматривать как абсолютный отрицательный предиктор получения сперматозоидов при повторной биопсии. Мы считаем, что многое здесь зависит не от наличия СКС как такового, а от соотношения различных гистологических паттернов: к примеру, при СКС, занимающем 100% препарата, прогноз явно должен быть хуже, чем при СКС, занимающем 95% препарата. Однако, в одной из работ, посвящённых повторным microTESE, индекс сперматогенеза Джонсена, количественно отражающий тяжесть нарушения сперматогенеза, не подтвердил статус самостоятельного предиктора ЧПС [221].

Выполнение микродиссекционных TESE в нашей выборке было сопряжено с очень низкой вероятностью развития осложнений, большая часть из которых относилась к I-II градации по Клавьену-Диндо. Острая задержка мочи с последующей катетеризацией мочевого пузыря после биопсии яичка (III степень по Клавьену-Диндо), вероятнее всего, была связана с последствиями спинальной анестезии. Десяти пациентам потребовалась ревизия мошонки по поводу гематомы. Малое количество наблюдений не позволило нам провести анализ факторов, которые повышают вероятность этого события. В большинстве случаев при ревизии не удавалось обнаружить кровоточащий сосуд, что делает сомнительной целесообразность подобной хирургической тактики при гематомах мошонки после microTESE. В одном случае ревизия мошонки завершилась орхэктомией, но это вмешательство выполнялось во внешнем учреждении по месту жительства пациента; на наш взгляд, в этой ситуации вполне можно было избежать выполнения орхэктомии. Это единственный случай в нашей

практике, когда microTESE привела к постоянным неблагоприятным последствиям. У части пациентов ($n = 47$) произошло временное снижение уровня тестостерона, но они не отмечали клинически выраженных симптомов гипогонадизма и через 6 месяцев вернулись к биохимически эугонадному статусу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе выполнения данной научной работы мы установили, что microTESE обеспечивает высокие шансы на получение сперматозоидов у пациентов с НОА, хотя ЧПС при этой процедуре в некоторых исследованиях может быть завышена из-за некорректного определения НОА. Мы воспользовались гистологическим критерием для отнесения пациентов по категориям ОА и НОА, что делает полученные нами результаты достаточно достоверными.

Как и ожидалось, отрицательными предикторами успеха применения методов хирургического получения сперматозоидов оказались уровень ФСГ и мутации локуса AZFc Y-хромосомы, хотя самостоятельная ценность и была довольно низкой. В то же время, мы получили данные, позволяющие предполагать, что важным предиктором неудачи microTESE не высокий уровень ФСГ сам по себе, а изолированное повышение уровня ФСГ на фоне нормальных уровней ЛГ и тестостерона. При этом повышение уровня ФСГ нередко оказывается умеренным, что объясняется особенностями функционирования системы отрицательной обратной связи гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси при НОА. Вероятно, с этим же связано то, что отрицательным предиктором успеха microTESE оказался уровень тестостерона. Положительными предикторами оказались объём яичек, уровень ингибина В и наличие указаний на орхипексию по поводу крипторхизма в детском возрасте. Невысокая эффективность описанных эндокринных параметров в качестве маркеров успеха microTESE была подтверждена нами с помощью ROC-анализа и подсчёта показателей AUC.

Мы описали также репродуктивные исходы у мужчин с бесплодием редкой этиологии. Как и ожидалось, редкие генетические синдромы характеризуется НОА и низкой ЧПС, а последствия перенесённых радикальных операций по поводу онкоурологических заболеваний включают в себя ОА с высокой ЧПС и адекватной ЧРД.

Анализ древа классификации позволил нам выделить категории пациентов с различной вероятностью получения сперматозоидов при НОА, что будет иметь определённое практическое значение.

Мы провели регрессионный анализ, который показал, что для PESA и TESA целесообразнее всего подбирать пациентов с высоким уровнем ингибина В и нормальным объёмом яичек. Пункционные методики при НОА характеризуются недопустимо низкой эффективностью. Кроме того, мы получили данные, которые указывают на необходимость выполнения PESA / TESA в условиях операционной с адекватным анестезиологическим обеспечением, так как при ряде состояний сперматозоиды удаётся получить только после конверсии в MESA с мультифокальной TESE. Настораживающим фактором здесь должно служить указание пациента на перенесённый ранее орхоэпидидимит, который может быть непосредственной причиной развития ОА. Часто базовые клинические и лабораторные данные не позволяют достоверно различить ОА и НОА до получения результатов гистологического исследования. Так, в нашем исследовании 60.6% из категории ОА перешли в категорию НОА после патологоанатомического заключения. Это мотивировало нас на выполнение части работы, посвящённой поиску предикторов неверного определения вида азооспермии при относительно благоприятных исходных параметрах. Любопытно, что одним из таких предикторов был регулярный перегрев органов мошонки (чаще всего – посещение сауны).

Учитывая длительный срок готовности и стоимость рутинных генетических анализов, мы считаем, что их выполнение оправдано не всегда. Это касается, в частности, пациентов с задокументированным наличием сперматозоидов в эякуляте и успешной пункционной биопсией в прошлом. Проведённый анализ показал, что вероятность обнаружения генетических аномалий минимальна в относительно старшем возрасте (> 39 лет), если до того момента у пациента не проявились какие-то соматические жалобы или яркие признаки нарушения гормональной регуляции, потребовавшие дообследования.

В работе показано, что ЧРД при ОА практически такова же, как и ЧРД при использовании сперматозоидов из эякулята у пар без мужского фактора бесплодия. ЧРД при НОА даже при условии удачного получения сперматозоидов была в 4 раза ниже, и это может объясняться малым количеством и качеством клеточного материала, получаемого даже при номинально успешной microTESE. С другой стороны, на вероятность рождения ребёнка после ICSI с использованием сперматозоидов, полученных хирургическим путём, не оказывал статистически значимого влияния ни один из обсуждаемых андрологических факторов. Важными предикторами были только возраст женщины и наличие гинекологической патологии, влияющей на эффективность программ ВРТ, а значит, при условии успешного получения сперматозоидов дальнейшие репродуктивные результаты зависят преимущественно от женского фактора.

Варикоцеле, как впрочем и перенесённые операции по поводу варикоцеле, не влияло ни на ЧПС, ни на ЧРД. Тем не менее, наблюдалась статистически значимая разница по частоте циклов ICSI, которые потребовались для рождения ребёнка, и это наблюдение может свидетельствовать о снижении качества ДНК тестикулярных и эпидидимальных сперматозоидов. У отдельных пациентов сперматозоиды могли появиться в эякуляте после варикоцелэктомии, но в дальнейшем они выбывали из исследования, так как у них исчезало показание непосредственно к использованию хирургических методов экстракции сперматозоидов. Выбывание таких благоприятных случаев могло исказить данный этап статистического анализа.

Наше исследование продемонстрировало необходимость совершенствования морфологического подхода к исследованию тестикулярных биоптатов. Стандартные заключения, в которых характеризуется наиболее часто встречающийся гистологический паттерн, предоставляют клиницисту неполноценную информацию. Истинная ценность гистологического исследования заключается в соотношении этих паттернов, зная которое, можно принять решение касательно выполнения повторной microTESE и проведения неoadьювантной

терапии с целью повышения ЧПС. Для этого целесообразно использовать сперматогенный индекс Джонсена или шкалу Бергмана-Клиша.

В работе описаны также повторные биопсии яичек и их придатков. Чёткой ассоциации между результатами первичной гистологии и результатом поиска сперматозоидов во время повторной MESA / TESE / microTESE не найдено. Даже при преобладающем СКС в первичной биопсии удавалось добиться обнаружения сперматозоидов при повторной операции, хотя гаметы были малого качества и пока не привели к зачатию и рождению ребёнка. Вышеупомянутые индексы сперматогенеза могли бы более точно выделить категорию больных, способных выиграть от повторных попыток microTESE.

Открытые методы биопсии яичка при азооспермии зарекомендовали себя как эффективный, безопасный и безальтернативный метод помощи мужчинам, стремящимся к биологическому отцовству.

ВЫВОДЫ

1. Значимыми негативными предикторами успеха биопсии яичка являются уровень ФСГ (ОВ = 0.966; 95% ДИ = 0.940–0.992), уровень тестостерона (ОВ = 0.965; 95% ДИ = 0.936–0.995) и мутации AZFc (ОВ = 0.305; 95% ДИ = 0.094–0.983), а положительными предикторами являются уровень ингибина В (ОВ = 1.011; 95% ДИ = 1.007–1.015), объём яичек (ОВ = 1.100; 95% ДИ = 1.068–1.132) и выполненная в детском возрасте по поводу крипторхизма орхипексия (ОВ = 2.979; 95% ДИ = 1.209–7.335), причём этиология необструктивной азооспермии практически не влияет на вероятность успеха хирургического получения сперматозоидов ($p > 0.05$ для всех рассмотренных этиологических факторов кроме мутаций AZFc); наименьшая вероятность получения сперматозоидов наблюдается у пациентов с уровнем ингибина В менее 68 пг/мл и уровнем ФСГ в диапазоне 15.1–19.7 мМЕ/мл.
2. Успешное получение сперматозоидов при выполнении процедуры PESA / TESA наиболее вероятно у пациентов с большим уровнем ингибина В в сыворотке крови (ОВ = 1.026; 95% ДИ = 1.011–1.041) и объёмом яичек (ОВ = 1.113; 95% ДИ = 1.026–1.207), однако даже при тщательном отборе пациентов по клиническим и лабораторным показателям пункционные методы оказались эффективными лишь в 72.4% случаев, а пациентам с острым эпидидимитом и операциями на придатках яичек в анамнезе требовалось выполнять конверсию в открытую микрохирургическую биопсию.
3. Ни один из андрологических факторов не был статистически значимым предиктором рождения ребёнка в результате ICSI с использованием полученных хирургическим путём сперматозоидов ($p > 0.05$ для всех рассмотренных факторов), важными негативными предикторами оказались только возраст женщины (ОВ = 0.909; 95% ДИ = 0.840–0.983) и наличие у неё гинекологической патологии (ОВ = 0.362; 95% ДИ = 0.149–0.882).

4. Единственным фактором, указывающим на вероятное наличие НОА у пациентов с нормальным гормональным профилем и объёмом яичек, является регулярное нарушение температурного режима с перегревом органов мошонки в анамнезе (ОВ = 1.989; 95% ДИ = 1.101–3.595); ошибочное определение вида азооспермии наиболее вероятно при уровне ингибина В менее 93 пг/мл.
5. У пациентов с истинной ОА тестикулярные сперматозоиды характеризуются значительно меньшим индексом фрагментации ДНК по сравнению с эпидидимальными (15.9% против 28.5%; $p = 0.0004$).
6. Отрицательными предикторами наличия генетических нарушений у мужчин с азооспермией являются возраст (ОВ = 0.884; 95% ДИ = 0.843–0.928), уровень ЛГ (ОВ = 0.967; 95% ДИ = 0.941–0.994), уровень эстрадиола (ОВ = 0.992; 95% ДИ = 0.988–0.997), а положительными предикторами являются уровень ФСГ (ОВ = 1.031; 95% ДИ = 1.009–1.054) и уровень пролактина (ОВ = 1.001; 95% ДИ = 1.000–1.003); вероятность наличия генетических причин азооспермии составляет менее 10% в возрасте до 30 лет при уровне ФСГ менее 5.5 мМЕ/мл, в возрасте 30–39 лет при уровне ФСГ менее 19.7 мМЕ/мл и в возрасте от 39 лет при любом уровне ФСГ.
7. Наличие варикоцеле на момент выполнения биопсии яичка практически не влияет на частоту получения сперматозоидов (38.9% против 41.7%, $p = 0.5$) и частоту рождения детей (19.3% против 18%, $p = 0.147$), но увеличивает число циклов ICSI, требующихся для рождения одного ребёнка (медиана: 3 против 2, $p < 0.00001$); в парах, где мужчине ранее выполнялась варикоцелэктомия, этот показатель был ниже, чем в парах, где у мужчины было варикоцеле на момент выполнения биопсии яичка (медиана: 1 против 3; $p = 0.00072$) вне зависимости от вида операции.
8. Сперматозоиды удалось обнаружить у 27 из 31 пациентов (87%) с гипосперматогенезом, у 5 из 8 (62.5%) пациентов с остановкой сперматогенеза и у 4 из 12 (33.3%) пациентов с сертоликлеточным синдромом в первичной биопсии, хотя ни один из гистологических паттернов не оказался статистически

значимым прогностическим фактором в отношении результата повторной биопсии яичка ($p > 0.05$ для всех).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При консультировании бесплодных пар следует учитывать, что шансы на успех при попытках хирургического получения сперматозоидов есть у всех категорий пациентов независимо от этиологии азооспермии, за исключением тех случаев, когда обнаружены мутации регионов AZFa и AZFb Y-хромосомы и очевидные анатомические факторы, делающие биопсию яичка невозможной.
2. Пункционные методы хирургического получения сперматозоидов следует выполнять у тщательно отобранной категории пациентов с высоким уровнем ингибина В и нормальным объёмом яичек в условиях, позволяющих выполнить конверсию в открытую биопсию (MESA, TESE, microTESE).
3. При определении стратегии ведения бесплодной пары с азооспермией следует учитывать, что в случае успешного получения сперматозоидов вероятность рождения ребёнка после проведения процедуры ICSI зависит преимущественно от гинекологических факторов и возраста женщины.
4. У пациентов с азооспермией, имеющих уровень ингибина В менее 93 пг/мл, постоянно подвергающихся нарушениям температурного режима с перегревом органов мошонки, а также у пациентов без явных факторов риска развития обструкции семенных путей следует подозревать НОА и начинать попытки хирургического получения сперматозоидов с открытых методик даже при нормальном объёме яичек и отсутствии изменений гормонального профиля.
5. Учитывая значительно меньший индекс фрагментации ДНК у сперматозоидов, полученных из яичка, во время процедур хирургического получения сперматозоидов у пациентов с обструктивной азооспермией всегда следует пытаться получить тестикулярные сперматозоиды, не ограничиваясь аспирацией содержимого придатков яичек.
6. Пациенты старше 39 лет с азооспермией без соматических проявлений, характерных для генетических аномалий, и без изолированного повышения уровня

ФСГ на фоне нормального уровня ЛГ в большинстве случаев не нуждаются в кариотипировании и анализе на мутации AZF-фактора.

7. Для повышения качества сперматозоидов и сокращения количества циклов ICSI, которые потребуются для рождения ребёнка, пациентам с азооспермией и варикоцеле следует выполнять варикоцелэктомию перед попытками хирургического получения сперматозоидов.

8. Пациентам не следует отказываться в выполнении повторной биопсии яичка, основываясь на результатах первичного гистологического исследования.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АС- арест сперматогенеза

ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения

ВРТ - вспомогательные репродуктивные технологии

ДИ - доверительный интервал

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ЛГ- лютеинизирующий гормон

МКР - межквартильный размах

НОА - необструктивная азооспермия

ОА - обструктивная азооспермия

ОВ - отношение вероятностей

РАРЧ - Российская ассоциация репродукции человека

СКС- синдром клеток Сертоли

ФСГ- фолликулостимулирующий гормон

ЧНБ – частота наступления беременности

ЧПС- частота получения сперматозоидов

ЧРД - частота рождения детей

ЧФ - частота фертилизации

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

AUC- area under the curve (площадь под кривой)

AZF - azoospermia factor (фактор азооспермии)

CFTR - cystic fibrosis transmembrane regulator (трансмембранный регулятор муковисцидоза)

ICSI - intracytoplasmic sperm injection (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в цитоплазму яйцеклетки)

MESA - microsurgical epididymal sperm aspiration (микрохирургическая аспирация сперматозоидов из придатка)

microTESE - microdissection testicular sperm extraction (микродиссекционная

экстракция сперматозоидов из яичка)

PESA - percutaneous epididymal sperm aspiration (чрезкожная аспирация сперматозоидов из придатка яичка)

ROC- receiver operating characteristic (рабочая характеристика приёмника)

TESA - testicular sperm aspiration (аспирация сперматозоидов из яичка)

TESE - testicular sperm extraction (экстракция сперматозоидов из яичка)

TUNEL - terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (метод TdT-опосредованной метки dUTP-конца разрыва цепи ДНК)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аль-Шукри, С.Х. Факторы, влияющие на вероятность обнаружения сперматозоидов при TESE у мужчин с азооспермией/ Аль-Шукри С.Х., Боровец С.Ю., Торопов В.А.// Урологические ведомости. 2016. Т. 6. № 6. С. 18-19.
2. Аль-Шукри, С.Х. Частота обнаружения сперматозоидов и вероятность осложнений различных видов биопсии яичка (TESA, TESE и microTESE) у больных с необструктивной азооспермией / С.Х. Аль-Шукри // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. – 2016. – Т. 23, № 1. – С. 10-14.
3. Боровец, С.Ю. Предбиопсийное моделирование состояния герминогенного эпителия при азооспермии с учётом эндокринных и генетических факторов / С.Ю. Боровец, В.А. Топоров, С.Х. Аль-Шукри // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2017. – Т. 176, № 5. – С. 50-53.
4. Боровец, С.Ю. Наш опыт коррекции повышенной степени фрагментации ДНК сперматозоидов с использованием препарата, содержащего микронутриенты/ Боровец С.Ю., Аль-Шукри С.Х., Белоусов В.Я.// Урологические ведомости. 2016. Т. 6. № 4. С. 45-46.
5. Варикоцеле и необструктивная азооспермия – с чего начать? / А.Ю. Попова, С.И. Гамидов, Гасанов Н.Г [и др.]// Андрология и генитальная хирургия. – 2017. – Том 18. - №4. – С. 77-80
6. Возможности липидного анализа семенной плазмы в прогнозировании успеха microtese у мужчин с азооспермией/ Гамидов С.И., Шатылко Т.В., Тамбиев А.Х [и др.]// Урология. 2022. № 4. С. 32-37.
7. Генетически обусловленные формы бесплодия у мужчин: основные характеристики и практические аспекты лабораторной диагностики/ Михайленко Д.С., Соболев И.Ю., Ефремов Е.А [и др.] // Экспериментальная и клиническая урология. 2020. № 1. С. 96-105.

8. Генетические факторы риска развития спорадических герминогенных опухолей яичка/ Немцова М.В., Ивкин Е.В., Трякин А.А [и др.] //Урология. 2017. № 1. С. 24-30.
9. Делеции в AZF локусе и нарушения сперматогенеза у мужчин с мозаицизмом по хромосоме Y/ Штаут М.И., Опарина Н.В., Шилова Н.В [и др.] // Медицинская генетика. 2022. Т. 21. № 11. С. 4-11.
10. Диагностика мужского бесплодия, ассоциированного с микроделециями в локусе AZF хромосомы Y/ Барков И.Ю., Сорока Н.Е., Попова А.Ю [и др.] //Акушерство и гинекология. 2014. № 1. С. 59-64.
11. Изолированное повышение уровня фолликулостимулирующего гормона как прогностический фактор негативного результата microTESE/ С. И. Гамидов, Т. В. Шатылко, Н. Г. Гасанов [и др.] // Андрология и генитальная хирургия. - 2023. - Т. 24. - № 2. - С. 85-94.
12. Иммунофенотипическая характеристика волокнистого компонента гематотестикулярного барьера при использовании клеточной и ударно-волновой терапии у пациентов с необструктивной азооспермией/ Артеменко С.А., М.В., Костин А.А., Демяшкин Г.А [и др.] // Гены и Клетки. 2022. Т. 17. № 3. С. 16.
13. Иммунофенотипическая характеристика волокнистого компонента гематотестикулярного барьера у пациентов с необструктивной азооспермией после применения клеточной терапии/ Епифанова М.В., Демяшкин Г.А., Костин А.А [и др.] // Андрология и генитальная хирургия. 2022. Т. 23. № 2. С. 27-33.
14. Клеточные технологии в лечении мужского бесплодия, обусловленного необструктивной азооспермией/ Епифанова М.В., Чалый М.Е., Переверзина Н.О [и др.] // Урология. 2017. № 4. С. 103-106.
15. Коршунов, М.Н. Клиническая эффективность использования тестикулярных сперматозоидов в программах вспомогательных репродуктивных технологий при высоком показателе ДНК-фрагментации / М.Н. Коршунов, Е.С.

- Коршунова, С.П. Даренков // Урологические ведомости. – 2017. – Т. 7, № 6. – С. 57-58.
16. Коршунов, М.Н. Влияние лучевой и химиотерапии на сперматогенез. Прогноз мужской фертильности после лечения онкологических заболеваний/ Коршунов М.Н., Коршунова Е.С., Даренков С.П.// Исследования и практика в медицине. 2017. Т. 4. № S2. С. 60-61.
 17. Куренков, А.В. Микрохирургическая экстракция сперматозоидов (MicroTESE) у пациентов с необструктивной азооспермией/ А.В. Куренков, С.Н. Куликов // Урологические ведомости. – 2017. – Т. 7, № 1. – С. 22-24.
 18. Липидомный профиль семенной плазмы при необструктивной азооспермии с остановкой созревания сперматозоидов/ Гамидов С.И., Шатылко Т.В., Тамбиев А.Х [и др.] // Вестник урологии. 2021. Т. 9. № 4. С. 30-39
 19. Лихоносков, Н.П. Роль ингибина В в регуляции сперматогенеза и его клиническая значимость при мужском бесплодии/ Лихоносков Н.П., Аюб А.Х., Боровец С.Ю.// Урологические ведомости. 2019. Т. 9. № 1. С. 39-45.
 20. Мейоз, сперматогенез и ультраструктура базальной мембраны семенных канальцев у пациентов с азооспермией/ Брагина Е.Е., Витязева И.И., Лелекова М.А [и др.]// Андрология и генитальная хирургия. 2019. Т. 20. № 1. С. 43-54.
 21. Методики получения сперматозоидов у пациентов с необструктивной азооспермией/ Ахвледиани Н.Д., Рева И.А., Чернушенко А.С [и др.]// Урология. 2021. № 4. С. 106-113.
 22. Опыт применения микрохирургической биопсии яичка и его придатка у пациентов с необструктивной азооспермией/ Касатонова Е.В., Ефремов Е.А., Мельник Я.И [и др.] // Экспериментальная и клиническая урология. 2014. № 4. С. 38-42.
 23. Оценка эффективности аутоплазмы, обогащенной тромбоцитарными факторами роста, и ударно-волновой терапии при лечении необструктивной азооспермии/ Артеменко С.А., Епифанова М.В., Костин А.А [и др.] // Гены и Клетки. 2022. Т. 17. № 3. С. 17.

24. Полноэкзомное секвенирование в комплексной диагностике генетически обусловленных форм мужского бесплодия, связанных с тяжелыми формами патозооспермии/ Соловова О.А., Опарина Н.В., Рыжкова О.П [и др.] // Медицинская генетика. 2022. Т. 21. № 10. С. 46-50.
25. Получение тестикулярных сперматозоидов у мужчин с азооспермией после лечения онкологических заболеваний: наш десятилетний опыт/ Ижбаев С.Х., Овчинников Р.И., Гамидов С.И [и др.] // Акушерство и гинекология. 2020. № 4. С. 173-175.
26. Применение вспомогательных репродуктивных технологий при сложных формах мужского бесплодия и азооспермии/ Шатылко Т.В., Гамидов С.И., Тамбиев А.Х [и др.] // Фармакология & Фармакотерапия. 2022. № 3. С. 10-16.
27. Применение хорионического гонадотропина в качестве гормональной стимулирующей терапии при патозооспермии/ Ефремов Е.А., Хизриев Х.З., Кастрикин Ю.В [и др.] // Экспериментальная и клиническая урология. 2017. № 4. С. 65-69.
28. Прогностические возможности протеомного анализа семенной плазмы у мужчин с азооспермией / Бржозовский А.Г., Гасанов Н.Г., Бугрова А.Е [и др.] // Андрология и генитальная хирургия. - 2021. - Т. 22. - № 3. - С. 18-24.
29. Прогностическая значимость микроделеций локусов AZF и синдрома Клайнфельтера у мужчин с азооспермией в отношении результативности биопсии яичка и исходов вспомогательных репродуктивных технологий (обзор литературы)/ Аль-шукри С.Х., Гзгзян А.М., Боровец С.Ю [и др.] // Нефрология. 2016. Т. 20. № 4. С. 40-46.
30. Прогностическая ценность различных показателей спермы относительно мужской фертильности/ Метелев А.Ю., Богданов А.Б., Ивкин Е.В [и др.] // Андрология и генитальная хирургия. 2015. Т. 16. № 4. С. 51-54.
31. Радикальные и органосохраняющие операции при злокачественных новообразованиях яичка/ Лоран О.Б., Богданов А.Б., Ивкин Е.В [и др.]// Анналы хирургии. 2014. № 1. С. 25-30.

32. Различные сочетания генетических факторов у мужчин с бесплодием и их влияние на фертильность/ Сафина Н.Ю., Яманди Т.А., Черных В.Б [и др.] // Медицинская генетика. 2020. Т. 19. № 12 (221). С. 75-76.
33. Результативность микрохирургической варикоцелэктомии у пациентов с необструктивной азооспермией/ Куликов С.Н., Куренков А.В., Шпиленя Е.С [и др.]// Медицинский вестник МВД. 2021. № 2 (111). С. 36-38.
34. Репродуктивный потенциал сперматозоидов, полученных хирургическим путем у пациентов с азооспермией / Гасанов Н.Г., Гамидов С.И., Шатылко Т.В [и др.] // Экспериментальная и клиническая урология. - 2019. - № 3. - С. 126-132.
35. Роль методов хирургического получения сперматозоидов у пациентов с азооспермией в программах вспомогательных репродуктивных технологий (обзор литературы) / С.И. Гамидов, А.Ю. Попова, Н.Г. Гасанов [и др.] // Андрология и генитальная хирургия. – 2018. – Том 19. - №3 – С. 27-34
36. Роль пункционной биопсии яичка в ведении пациентов с азооспермией / Гасанов Н.Г., Гамидов С.И., Шатылко Т.В [и др.] // Исследования и практика в медицине. - 2020.- Т. 7.- № 3. - С. 43-50.
37. Торопов, В.А. Предикторы результативности TESE (создание алгоритма "дерево решений")/ Торопов В.А., Боровец С.Ю., Аль-Шукри С.Х.// Урологические ведомости. 2017. Т. 7. № 5. С. 113-114.
38. Торопов, В.А. Прогнозирование исходов биопсии яичка у больных с азооспермией с учетом клинических, эндокринных и генетических факторов / В.А. Торопов, С.Ю. Боровец, В.Н. Ткачук // Consilium Medicum. – 2017. – Т. 19, № 7. – Р. 83-85.
39. Торопов, В.А. Эндокринные предикторы результативности биопсии яичка у больных с азооспермией / В.А. Торопов // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2017. – Т. 176, № 3. – С. 38-42.

40. Трудности в дифференциальной диагностике обструктивной и необструктивной азооспермии / Гамидов С.И., Шатылко Т.В., Гасанов Н.Г [и др.] // Вестник урологии. -2022. - Т. 10. - № 2.- С. 19-31
41. Факторы риска развития тестикулярного рака у пациентов с мужским бесплодием, обусловленного микроделецией фактора AZFC/ Ивкин Е.В., Богданов А.Б., Метелев А.Ю [и др.] // Московская медицина. 2017. № S2. С. 60-61.
42. Характеристика состояния сперматогенеза у мужчин с бесплодием, имеющих различные типы делеций AZFc-региона/ Черных В.Б., Руднева С.А., Сорокина Т.М [и др.] // Андрология и генитальная хирургия. 2014. Т. 15. № 2. С. 48-57.
43. Частота выявления делеций AZF, мутаций CFTR и длинных аллелей CAG-повтора AR при первичной лабораторной диагностике в гетерогенной группе пациентов с мужским бесплодием/ Михайленко Д.С., Соболев И.Ю., Сафронова Н.Ю [и др.]// Урология. 2019. № 3. С. 101-107.
44. Эффективность гипербарической оксигенации в коррекции уровня фрагментации днк сперматозоидов у мужчин с идиопатическим бесплодием/ Метелев А.Ю., Богданов А.Б., Ивкин Е.В [и др.]// Экспериментальная и клиническая урология. 2015. № 3. С. 49-54.
45. Abdel Raheem, A. Testicular histopathology as a predictor of a positive sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia / A. Abdel Raheem // BJU Int. – 2013. – Vol. 111, № 3. – P. 492-499.
46. Aboulghar, M.A. Fertilization and pregnancy rates after intracytoplasmic sperm injection using ejaculate semen and surgically retrieved sperm / M.A. Aboulghar // Fertil. Steril. – 1997. – Vol. 68, № 1. – P. 108-111.
47. Aflatoonian, B. In vitro post-meiotic germ cell development from human embryonic stem cells / B. Aflatoonian // Hum. Reprod. – 2009. – Vol. 24, № 12. – P. 3150-3159.
48. Agca, Y. Cryopreservation of spermatozoa in assisted reproduction / Y. Agca, J.K. Crister // Semin. Reprod. Med. – 2002. – Vol. 20, № 1. – P. 15-23.

49. Aitken, R.J. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa / R.J. Aitken // *Biol. Reprod.* – 1998. – Vol. 59, № 5. – P. 1037-1046.
50. Amer, M. Prospective comparative study between microsurgical and conventional testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia: follow-up by serial ultrasound examinations / M. Amer // *Hum. Reprod.* – 2000. – Vol. 15, № 3. – P. 653-656.
51. Aponte, P.M. Biotechnological approaches to the treatment of aspermatogenic men / P.M. Aponte, S. Schlatt, L.R. Franca // *Clinics.* – 2013. – Vol. 68, № S1. – P. 157-167.
52. Aydin, T. Effects of testicular histopathology on sperm retrieval rates and ICSI results in non-obstructive azoospermia / T. Aydin // *J. Obstet. Gynaecol.* – 2015. – Vol. 35, № 8. – P. 829-831.
53. Aziz, N. The importance of semen analysis in the context of azoospermia / N. Aziz // *Clinics.* – 2013. – Vol. 68, № S1. – P. 35-38.
54. Belva, F. Neonatal outcome of 724 children born after ICSI using non-ejaculated sperm / F. Belva // *Hum. Reprod.* – 2011. – Vol. 26, № 7. – P. 1752-1758.
55. Bernie, A.M. Comparison of microdissection testicular sperm extraction, conventional testicular sperm extraction, and testicular sperm aspiration for nonobstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis / A.M. Bernie // *Fertil. Steril.* – 2015. – Vol. 104, № 5. – P. 1099-1103.
56. Berookhim, B.M. Microdissection testicular sperm extraction in men with Sertoli cell-only testicular histology / B.M. Berookhim // *Fertil. Steril.* – 2014. – Vol. 102, № 5. – P. 1282-1286.
57. Bobjer, J. High prevalence of androgen deficiency and abnormal lipid profile in infertile men with non-obstructive azoospermia / J. Bobjer // *Int. J. Androl.* – 2012. – Vol. 35, № 5. – P. 688-694.
58. Bonarriba, C.R. Predictive factors of successful sperm retrieval in azoospermia / C.R. Bonarriba // *Actas Urol. Esp.* – 2013. – Vol. 37, № 5. – P. 266-272.

59. Boukari, K. Lack of androgen receptor expression in Sertoli cells accounts for the absence of anti – Mullerian hormone repression during early human testis development / K. Boukari // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2009. – Vol. 94, № 5. – P. 1818-1825.
60. Brandell, R.A. AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction: preliminary report of a prognostic genetic test / R.A. Brandell // *Hum. Reprod.* – 1998. – Vol. 13, № 1. – P. 2812-2815.
61. Bromage, S.J. Sperm retrieval rates in subgroups of primary azoospermic males / S.J. Bromage // *Eur. Urol.* – 2007. – Vol. 51, № 2. – P. 534-540.
62. Caroppo, E. Testicular histology may predict the successful sperm retrieval in patients with non-obstructive azoospermia undergoing conventional TESE: a diagnostic accuracy study / E. Caroppo // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2016. – Vol. 34, № 1. – P. 149-154.
63. Carpi, A. Controversies in the management of nonobstructive azoospermia / A. Carpi, E. Sabanegh, J. Mechanick // *Fertil. Steril.* – 2009. – Vol. 91, № 4. – P. 963-970.
64. Chatterjee, S. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing / S. Chatterjee, C. Gagnon // *Mol. Reprod. Dev.* – 2001. – Vol. 59, № 4. – P. 451-458.
65. Cissen, M. Prediction model for obtaining spermatozoa with testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia / M. Cissen // *Hum. Reprod.* – 2016. – Vol. 31, № 9. – P. 1934-1941.
66. G.M. Microsurgical TESE versus conventional TESE for ICSI in non-obstructive azoospermia: a randomized controlled study / G.M. Colpi // *Reprod. Biomed. Online.* – 2009. – Vol. 18, № 3. – P. 315-319.
67. Colpi, G.M. Sperm retrieval for intra-cytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia / G.M. Colpi // *Minerva Urol. Nefrol.* – 2005. – Vol. 57, № 2. – P. 99-107.

68. Dafopoulos, K. Factors affecting outcome after ICSI with spermatozoa retrieved from cryopreserved testicular tissue in non-obstructive azoospermia / K. Dafopoulos // *Reprod. Biomed. Online.* – 2005. – Vol. 10, № 4. – P. 455-460.
69. Dalzell, L.H. Effects of 24-hour incubation after freeze-thawing on DNA fragmentation of testicular sperm from infertile and fertile men / L.H. Dalzell // *Fertil. Steril.* – 2003. – Vol. 79, № S3. – P. 1670-1672.
70. Dalzell, L.H. Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm / L.H. Dalzell // *Fertil. Steril.* – 2004. – Vol. 82, № 5. – P. 1443-1445.
71. Damian, D. Predictive factors of successful sperm retrieval in men with nonobstructive azoospermia / D. Damian // *Rom. J. Ob. Gyn.* – 2005. – Vol. 5, № 18. – P. 230-233.
72. De Croo, I. Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICSI with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa / I. De Croo // *Hum. Reprod.* – 1998. – Vol. 13, № 7. – P. 1893-1897.
73. Deruyver, Y. Outcome of microdissection TESE compared with conventional TESE in non-obstructive azoospermia: a systematic review / Y. Deruyver, D. Vanderschueren, F. Van Der Aa // *Andrology.* – 2014. – Vol. 2, № 1. – P. 20-24.
74. Dohle, G.R. Testicular biopsy: clinical practice and interpretation / G.R. Dohle, S. Elzanaty, N.J. Van Casteren // *Asian J. Androl.* – 2012. – Vol. 14, № 1. – P. 88-93.
75. Donoso, P. Which is the best sperm retrieval technique for non-obstructive azoospermia? A systematic review / P. Donoso, H. Tournaye, P. Devroey // *Hum. Reprod. Update.* – 2007. – Vol. 13, № 6. – P. 539-549.
76. Eizabal, C. Complete meiosis from human induced pluripotent stem cells / C. Eguizabal // *Stem Cells.* – 2011. – Vol. 29, № 8. – P. 1186-1195.
77. El-Haggar, S. Fine needle aspiration vs. mTESE in non-obstructive azoospermia / S. El-Haggar // *Int. J. Androl.* – 2008. – Vol. 31, № 6. – P. 595-601.

78. Enatsu, N. Predictive factors of successful sperm retrieval on microdissection testicular sperm extraction in Japanese men / N. Enatsu // *Reprod. Med. Biol.* –2016. – Vol. 15, № 1. – P. 29-33.
79. Endo, Y. Simple vitrification for small numbers of human spermatozoa / Y. Endo // *Reprod. Biomed. Online.* – 2012. – Vol. 24, № 3. – P. 301-307.
80. Esteves, S.C. An update on the clinical assessment of the infertile male / S.C. Esteves, R. Miyaoka, A. Agarwal // *Clinics.* – 2011. – Vol. 66, № 4. – P. 691-700.
81. Esteves, S.C. Clinical management of infertile men with nonobstructive azoospermia / S.C. Esteves // *Asian J. Androl.* – 2015. – Vol. 17, № 3. – P. 459-470.
82. Esteves, S.C. Comparison of sperm retrieval and reproductive outcome in azoospermic men with testicular failure and obstructive azoospermia treated for infertility / S.C. Esteves // *Asian J. Androl.* – 2014. – Vol. 16, № 4. – P. 602-606.
83. Esteves, S.C. Laboratory handling of epididymal and testicular spermatozoa: What can be done to improve sperm injections outcome / S.C. Esteves, A.C. Varghese // *J. Hum. Reprod. Sci.* – 2012. – Vol. 5, № 3. – P. 233-243.
84. Esteves, S.C. Microdissection testicular sperm extraction (micro-TESE) as a sperm acquisition method for men with nonobstructive azoospermia seeking fertility: operative and laboratory aspects / S.C. Esteves // *Int. Braz. J. Urol.* – 2013. – Vol. 39, № 3. – P. 440.
85. Esteves, S.C. Reproductive outcomes, including neonatal data, following sperm injection in men with obstructive and nonobstructive azoospermia: case series and systematic review / S.C. Esteves, A. Agarwal // *Clinics.* – 2013. – Vol. 68, № S1. – P. 141-150.
86. Esteves, S.C. Sperm retrieval rate (SRR) in nonobstructive azoospermia (NOA) are related to testicular histopathology results but not to the etiology of azoospermia / S.C. Esteves // *Fertil. Steril.* – 2010. – Vol. 94, № S4. – P. 132.
87. Esteves, S.C. Surgical treatment of male infertility in the era of intracytoplasmic sperm injection - new insights / S.C. Esteves, R. Miyaoka, A. Agarwal // *Clinics.* – 2011. – Vol. 66, № 8. – P. 1463-1477.

88. Esteves, S.C. The azoospermic male: current knowledge and future perspectives / S.C. Esteves, A. Agarwal // *Clinics*. – 2013. – Vol. 68, № S1. – P. 1-4.
89. Ezeh, U.I. Establishment of predictive variables associated with testicular sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia / U.I. Ezeh // *Hum. Reprod.* – 1999. – Vol. 14, № 4. – P. 1005-1012.
90. Fraietta, R. Hypogonadotropic hypogonadism revisited / R. Fraietta, D.S. Zylberstejn, S.C. Esteves // *Clinics*. – 2013. – Vol. 68, № S1. – P. 81-88.
91. Franco G. A novel stepwise micro-TESE approach in non obstructive azoospermia / G. Franco // *BMC Urol.* – 2016. – Vol. 16, № 1. – P. 20-27.
92. Friedler, S. The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa from patients with obstructive azoospermia – a comparative study / S. Friedler // *Hum. Reprod.* – 1998. – Vol. 13, № 7. – P. 1872-1877.
93. Ghalayini, I.F. Clinical comparison of conventional testicular sperm extraction and microdissection techniques for non-obstructive azoospermia / I.F. Ghalayini // *J. Clin. Med. Res.* – 2011. – Vol. 19, № 3. – P. 124-131.
94. Ghazzawi, I.M. Comparison of the fertilizing capability of spermatozoa from ejaculates, epididymal aspirates and testicular biopsies using intracytoplasmic sperm injection / I.M. Ghazzawi // *Hum. Reprod.* – 1998. – Vol. 13, № 2. – P. 348-352.
95. Gil-Salom, M. Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa / M. Gil-Salom // *Hum. Reprod.* – 1996. – Vol. 11, № 6. – P. 1309-1313.
96. Gilmore, J.A. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation / J.A. Gilmore // *Biol. Reprod.* – 1998. – Vol. 58, № 1. – P. 28-36.
97. Gnessi, L. Testicular histopathology, semen analysis and FSH, predictive value of sperm retrieval: supportive counseling in case of reoperation after testicular sperm extraction (TESE) / L. Gnessi // *BMC Urol.* – 2018. – Vol. 18. – P. 63.

98. Gonçalves, C. Y-chromosome microdeletions in nonobstructive azoospermia and severe oligozoospermia / C. Gonçalves // *Asian J. Androl.* – 2017. – Vol. 19, № 3. – P. 338-345.
99. Greco, E. Birth of 16 healthy children after ICSI in cases of nonmosaic Klinefelter syndrome / E. Greco // *Hum. Reprod.* – 2013. – Vol. 28, № 5. – P. 1155-1160.
100. Gul, U. Sperm retrieval and live birth rates in presumed Sertoli-cell-only syndrome in testis biopsy: a single centre experience / U. Gul // *Andrology.* – 2013. – Vol. 1, № 1. – P. 47-51.
101. Guler, I. Impact of testicular histopathology as a predictor of sperm retrieval and pregnancy outcome in patients with nonobstructive azoospermia: correlation with clinical and hormonal factors / I. // *Andrologia.* – 2016. – Vol. 48, № 7. – P. 765-773.
102. Güneri, Ç. Effects of clinical, laboratory and pathological features on successful sperm retrieval in non-obstructive azoospermia / Ç. Güneri, T. Alkibay, L. Tunç // *Turk. J. Urol.* – 2016. – Vol. 42, № 3. – P. 168-177.
103. Habermann, H. In vitro fertilization outcomes after intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa / H. Habermann // *Fertil. Steril.* – 2000. – Vol. 73, № 5. – P. 955-960.
104. Haimov-Kochman, R. The value of repeat testicular sperm retrieval in azoospermic men / R. Haimov-Kochman // *Fertil. Steril.* – 2009. – Vol. 91, № 4S. – P. 1401-1403.
105. Hamada, A.J. A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia / A.J. Hamada, S.C. Esteves, A. Agarwal // *Clinics.* – 2013. – Vol. 68, № S1. – P. 39-60.
106. Hammoud, A. An aromatase polymorphism modulates the relationship between weight and estradiol levels in obese men / A. Hammoud // *Fertil. Steril.* – 2010. – Vol. 94, № 5. – P. 1734-1738.
107. Hassan, M.A. Effect of male age on fertility: evidence for the decline in male fertility with increasing age / M.A. Hassan, S.R. Killick // *Fertil. Steril.* – 2003. – Vol. 79, № S3. – P. 1520-1527.

108. Haydardedeoglu, B. The effect of prior varicocelelectomy in patients with nonobstructive azoospermia on intracytoplasmic sperm injection outcomes: a retrospective pilot study / B. Haydardedeoglu // *Urology*. – 2010. – Vol. 75, № 1. – P. 83-86.
109. He, X. Spermatogenesis affects the outcome of ICSI for azoospermic patients rather than sperm retrieval method / X. He // *Syst. Biol. Reprod. Med.* – 2010. – Vol. 56, № 6. – P. 457-464.
110. Hessel, M. Cytological evaluation of spermatogenesis: a novel and simple diagnostic method to assess spermatogenesis in non-obstructive azoospermia using testicular sperm extraction specimens / M. Hessel // *Andrology*. – 2015. – Vol. 3, № 3. – P. 481-490.
111. Holden, C.A. Frozen-thawed epididymal spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection / C.A. Holden // *Fertil. Steril.* – 1997. – Vol. 67, № 1. – P. 81-87.
112. Hopps, C.V. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa AZFb and AZFc regions / C.V. Hopps // *Hum. Reprod.* – 2003. – Vol. 18, № 8. – P. 1660-1665.
113. Hourvitz, A. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using cryopreserved sperm from men with malignant neoplasm yields high pregnancy rates / A. Hourvitz // *Fertil. Steril.* – 2008. – Vol. 90, № 3. – P. 557-563.
114. Hussein, A. Optimization of spermatogenesis-regulating hormones in patients with non-obstructive azoospermia and its impact on sperm retrieval: a multicentre study / A. Hussein // *BJU Int.* – 2013. – Vol. 111, № 3B. – P. E110-E114.
115. Inci, K. Sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection in men with nonobstructive azoospermia, and treated and untreated varicocele / K. Inci // *J. Urol.* – 2009. – Vol. 182, № 4. – P. 1500-1505.
116. Ishikawa, T. Clinical and hormonal findings in testicular maturation arrest / T. Ishikawa, H. Fujioka, M. Fujisawa // *BJU Int.* – 2004. – Vol. 94, № 9. – P. 1314-1316.

117. Ishikawa, T. Learning curves of microdissection testicular sperm extraction for nonobstructive azoospermia / T. Ishikawa // *Fertil. Steril.* – 2010. – Vol. 94, № 3. – P. 1008-1011.
118. Jezek, D. Successful testicular sperm extraction (TESE) in spite of high serum follicle stimulating hormone and azoospermia: correlation between testicular morphology, TESE results, semen analysis and serum hormone values in 103 infertile men / D. Jezek, U.A. Knuth, W. Schulze // *Hum. Reprod.* – 1998. – Vol. 13, № 5. – P. 1230-1234.
119. Kalsi, J. Analysis of the outcome of intracytoplasmic sperm injection using fresh or frozen sperm / J. Kalsi // *BJU Int.* – 2010. – Vol. 107, № 7. – P. 1124-1128.
120. Kato, Y. Expression of testicular androgen receptor in non-obstructive azoospermia and its change after hormonal therapy / Y. Kato, K. Shiraishi, H. Matsuyama // *Andrology.* – 2014. – Vol. 2, № 5. – P. 734-740.
121. Kleiman, S.E. Screening for partial AZFa microdeletions in the Y chromosome of infertile men: is it of clinical relevance? / S.E. Kleiman // *Fertil. Steril.* – 2012. – Vol. 98, № 1. – P. 43-47.
122. Kleiman, S.E. The likelihood of finding mature sperm cells in men with AZFb or AZFb-c deletions: six new cases and a review of the literature (1994-2010) / S.E. Kleiman // *Fertil. Steril.* – 2011. – Vol. 95, № 6. – P. 2005-2012.
123. Kovacic, B. Clinical use of pentoxifylline for activation of immotile testicular sperm before ICSI in patients with azoospermia / B. Kovacic, V. Vlaisavljevic, M. Reljic // *J. Androl.* – 2006. – Vol. 27, № 1. – P. 45-52.
124. Krausz, C. European Academy of Andrology. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013 / C. Krausz // *Andrology.* – 2014. – Vol. 2, № 1. – P. 5-19.
125. Kumar, M. Novel insights into the genetic and epigenetic paternal contribution to the human embryo / M. Kumar // *Clinics.* – 2013. – Vol. 68, № S1. – P. 5-14.
126. Kumar, R. Medical management of non-obstructive azoospermia / R. Kumar // *Clinics.* – 2013. – Vol. 68, № S1. – P. 75-79.

127. Kupker, W. Use of frozen-thawed testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection / W. Kupker // *Fertil. Steril.* – 2000. – Vol. 73, № 3. – P. 453-458.
128. Leão Rde, B. Gonadotropin therapy in assisted reproduction: an evolutionary perspective from biologics to biotech / B. Leão Rde, S.C. Esteves // *Clinics.* – 2014. – Vol. 69, № 4. – P. 279-293.
129. Lellei, I. Histological evaluation of multiple testicular biopsies helping assisted reproduction / I. Lellei, E. Magyar, E. Erdei // *Pathol. Res. Pract.* – 2001. – Vol. 197, № 11. – P. 727-733.
130. Lewin, A. Testicular needle aspiration: The alternative method for sperm retrieval in non-obstructive azoospermia / A. Lewin, B. Reubinoff, A. Porat-Kratz // *Hum. Reprod.* – 1999. – Vol. 14, № 7. – P. 1785-1790.
131. Longepied, G. Complete deletion of the AZFb interval from the Y chromosome in an oligozoospermic man / G. Longepied // *Hum. Reprod.* – 2010. – Vol. 25, № 10. – P. 2655-2663.
132. Marconi, M. Combined trifocal and microsurgical testicular sperm extraction is the best technique for testicular sperm retrieval in “low-chance” nonobstructive azoospermia / M. Marconi // *Eur. Urol.* – 2012. – Vol. 62, № 4. – P. 713-719.
133. Martinez, M. Screening for AZF deletion in a large series of severely impaired spermatogenesis patients / M. Martinez // *J. Androl.* – 2000. – Vol. 21, № 5. – P. 651-655.
134. Matthiesson, K.L. The relative roles of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in maintaining spermatogonial maturation and spermiation in normal men / K.L. Matthiesson // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2006. – Vol. 91, № 10. – P. 3962-3969.
135. McLachlan, R.I. Histological evaluation of the human testis - approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review / R.I. McLachlan // *Hum. Reprod.* – 2007. – Vol. 22, № 1. – P. 2-16.

136. McLernon, D.J. Clinical decision-making in azoospermic men: in search of the ideal prediction model / D.J. McLernon, S. Bhattacharya // *Hum Reprod.* – 2016. – Vol. 31, № 9. – P. 1931-1933.
137. Meijerink, A.M. Prediction model for live birth in ICSI using testicular extracted sperm / A.M. Meijerink // *Hum. Reprod.* – 2016. – Vol. 31, № 9. – P. 1942-1951.
138. Meseguer, M. Sperm DNA fragmentation levels in testicular sperm samples from azoospermic males as assessed by the sperm chromatin dispersion (SCD) test / M. Meseguer // *Fertil. Steril.* – 2009. – Vol. 92, № 5. – P. 1638-1645.
139. Mitchell, V. Correlation between testicular sperm extraction outcomes and clinical, endocrine and testicular histology parameters in 120 azoospermic men with normal serum FSH levels / V. Mitchell // *Int. J. Androl.* – 2011. – Vol. 34, № 4. – P. 299-305.
140. Mossad, H. Impact of cryopreservation on spermatozoa from infertile men: implications for artificial insemination / H. Mossad // *Arch. Androl.* – 1994. – Vol. 33, № 1. – P. 51-57.
141. Nariyoshi, S. Clinical value of ultrasonographic (US) analysis of seminiferous tubules for predicting successful sperm retrieval in patients with non-obstructive azoospermia (NOA) / S. Nariyoshi // *Fertil. Steril.* – 2017. – Vol. 108, № 3S. – P. e306.
142. Nassar, Z.A. Fine needle testicular sperm aspiration: an alternative to open testicular biopsy in patients with non-obstructive azoospermia / Z.A. Nassar // *Fertil. Steril.* – 2001. – Vol. 76, № 3. – P. 137.
143. Navarro-Costa, P. Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in)fertility? / P. Navarro-Costa // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 2010. – P. 936569.
144. Nemtsova, M.V. Polymorphisms of KITLG, SPRY4, and BAK1 genes in patients with testicular germ cell tumors and individuals with infertility associated with AZFC deletion of the Y chromosome/ Nemtsova M.V., Ivkin E.V., Loran O.B.// *Molecular Biology.* 2016. V. 50. № 6. P. 845-851.

145. Nicopoulos, J.D. Use of surgical sperm retrieval in azoospermic men: a meta-analysis / J.D. Nicopoulos // *Fertil. Steril.* – 2004. – Vol. 82, № 3. – P. 691-701.
146. Niederberger, C. Re: microdissection testicular sperm extraction in men with sertoli cell-only testicular histology / C. Niederberger // *J. Urol.* – 2015. – Vol. 193, № 5. – P. 1605-1606.
147. Nogueira, D. Light and electron microscopic analysis of human testicular spermatozoa and spermatids from frozen and thawed testicular biopsies / D. Nogueira // *Hum. Reprod.* – 1999. – Vol. 14, № 8. – P. 2041-2049.
148. O'Connell, M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function / M. O'Connell, N. McClure, S.E. Lewis // *Hum. Reprod.* – 2002. – Vol. 17, № 3. – P. 704-709.
149. O'Shaughnessy, P.J. Direct action through the Sertoli cells is essential for androgen stimulation of spermatogenesis / P.J. O'Shaughnessy // *Endocrinology.* – 2010. – Vol. 151, № 5. – P. 2343-2348.
150. Oates, R.D. Clinical characterization of 42 oligospermic or azoospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI / R.D. Oates // *Hum. Reprod.* – 2002. – Vol. 17, № 11. – P.2813-2824.
151. Okada, H. Conventional versus microdissection testicular sperm extraction for nonobstructive azoospermia / H. Okada // *J. Urol.* – 2002. – Vol. 168, № 3. – P. 1063-1067.
152. Oliveira Filho, A.B. Microdissection testicular sperm extraction causes spermatogenic alterations in the contralateral testis / A.B. Oliveira Filho // *Genet. Mol. Res.* – 2010. – Vol. 9, № 3. – P. 1405-1413.
153. Palermo, G.D. Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men / G.D. Palermo // *Hum. Reprod.* – 1999. – Vol. 14, № 3. – P. 741-748.
154. Park, Y.S. Influence of motility on the outcome of in vitro fertilization /intracytoplasmic sperm injection with fresh vs. frozen testicular sperm from men

- with obstructive azoospermia / Y.S. Park // *Fertil. Steril.* – 2003. – Vol. 80, № 3. – P. 526-530.
155. Plotton, I. Preliminary results of a prospective study of testicular sperm extraction in young versus adult patients with nonmosaic 47, XXY Klinefelter syndrome / I. Plotton // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2015. – Vol. 100, № 3. – P. 961-967.
156. Pylyp, L.Y. Chromosomal abnormalities in patients with oligozoospermia and non-obstructive azoospermia / L.Y. Pylyp // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2013. – Vol. 30, № 5. – P. 729-732.
157. Rajfer, J. Timing of sperm harvesting: is there room for improvement? / J. Raifer // *Rev. Urol.* – 2008. – Vol. 10, № 2. – P. 170-171.
158. Rajpert-De Meyts, E. Deletions of the Y chromosome are associated with sex chromosome aneuploidy but not with Klinefelter syndrome / E. Rajpert-De Meyts // *Acta Paediatr.* – 2011. – Vol. 100, № 6. – P. 900-902.
159. Ramasamy, R. Age does not adversely affect sperm retrieval in men undergoing microdissection testicular sperm extraction / R. Ramasamy // *Fertil. Steril.* – 2014. – Vol. 101, № 3. – P. 653-655.
160. Ramasamy, R. Duration of microdissection testicular sperm extraction procedures: relationship to sperm retrieval success / R. Ramasamy // *J. Urol.* – 2011. – Vol. 185, № 4. – P. 1394-1397.
161. Ramasamy, R. High serum FSH levels in men with nonobstructive azoospermia does not affect success of microdissection testicular sperm extraction / R. Ramasamy // *Fertil. Steril.* – 2009. – Vol. 92, № 2. – P. 590-593.
162. Ramasamy, R. Localization of sperm during microdissection testicular sperm extraction in men with nonobstructive azoospermia / R. Ramasamy // *J. Urol.* – 2013. – Vol. 189, № 2. – P. 643-646.
163. Ramasamy, R. Medical therapy for spermatogenic failure / R. Ramasamy, P.J. Stahl, P.N. Schlegel // *Asian J. Androl.* – 2012. – Vol. 14, № 1. – P. 57-60.

164. Ramasamy, R. Microdissection testicular sperm extraction: effect of prior biopsy on success of sperm retrieval / R. Ramasamy, P.N. Schlegel // J. Urol. – 2007. – Vol. 177, № 4. – P. 1447-1449.
165. Ramasamy, R. Structural and functional changes to the testis after conventional versus microdissection testicular sperm extraction / R. Ramasamy, N. Yagan, P.N. Schlegel // Urology. – 2005. – Vol. 65, № 6. – P. 1190-1194.
166. Ramasamy, R. Successful fertility treatment for Klinefelter's syndrome / R. Ramasamy // J. Urol. – 2009. – Vol. 182, № 3. – P. 1108-1113.
167. Ramasamy, R. Successful repeat microdissection testicular sperm extraction in men with nonobstructive azoospermia / R. Ramasamy // J. Urol. – 2011. – Vol. 185, № 3. – P. 1027-1031.
168. Ravizzini, P. Microdissection testicular sperm extraction and IVF-ICSI outcome in nonobstructive azoospermia / P. Ravizzini // Andrologia. – 2008. – Vol. 40, № 4. – P. 219-226.
169. Reifsnnyder, J.E. Role of optimizing testosterone before microdissection testicular sperm extraction in men with nonobstructive azoospermia / J.E. Reifsnnyder // J. Urol. – 2012. – Vol. 188, № 2. – P. 532-536.
170. Reijo, R. Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome / R. Reijo // Lancet. – 1996. – Vol. 347, № 9011. – P. 1290-1293.
171. Sabbaghian, M. Comparison of sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection outcome in patients with and without Klinefelter syndrome / M. Sabbaghian // Urology. – 2014. – Vol. 83, № 1. – P. 107-110.
172. Safar, Gamidov. Azoospermic men with isolated elevation of folliclestimulating hormone represent a specific subpopulation of patients with poor reproductive outcomes / Safar Gamidov, Taras Shatylo, Natig Gasanov // Clinical and Experimental Reproductive Medicine. - 2022. – Vol.49, №1 – P. 62-69.

173. Salehi, P. Factors influencing sperm retrieval following testicular sperm extraction in nonobstructive azoospermia patients / P. Salehi // *Clin. Exp. Reprod. Med.* – 2017. – Vol. 44, № 1. – P. 22-27.
174. Sato, T. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes / T. Sato // *Nature*. – 2011. – Vol. 471, № 7339. – P. 504-507.
175. Schiff, J.D. Success of testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in men with Klinefelter syndrome / J.D. Schiff // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2005. – Vol. 90, № 11. – P. 6263-6267.
176. Schlegel, P.N. Role of varicocelectomy in men with nonobstructive azoospermia / P.N. Schlegel, J. Kaufmann // *Fertil. Steril.* – 2004. – Vol. 81, № 6. – P. 1585-1588.
177. Schlegel, P.N. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision / P.N. Schlegel // *Hum. Reprod.* – 1999. – Vol. 14, № 1. – P. 131-135.
178. Schoor, R.A. The role of testicular biopsy in the modern management of male infertility / R.A. Schoor // *J. Urol.* – 2002. – Vol. 167, № 1. – P. 197-200.
179. Schwarzer, J.U. Male factors determining the outcome of intracytoplasmic sperm injection with epididymal and testicular spermatozoa / J.U. Schwarzer // *Andrologia*. – 2003. – Vol. 35, № 4. – P. 220-226.
180. Seo, J.T. Predictive factors of successful testicular sperm recovery in non-obstructive azoospermia patients / J.T. Seo, W.J. Ko // *Int. J. Androl.* – 2001. – Vol. 24, № 5. – P. 306-310.
181. Shinjo, E. The effect of human chorionic gonadotropin-based hormonal therapy on intratesticular testosterone levels and spermatogonial DNA synthesis in men with non-obstructive azoospermia / E. Shinjo, K. Shiraishi, H. Matsuyama // *Andrology*. – 2013. – Vol. 1, № 6. – P. 929-935.
182. Shiraishi, K. Hormonal therapy for non-obstructive azoospermia: basic and clinical perspectives / K. Shiraishi // *Reprod. Med. Biol.* – 2015. – Vol. 14, № 2. – P. 65-72.

183. Shiraishi, K. Human chorionic gonadotrophin treatment prior to microdissection testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia / K. Shiraishi // *Hum. Reprod.* – 2012. – Vol. 27, № 2. – P. 331-339
184. Shufaro, Y. Impact of repeated testicular fine needle aspirations (TEFNA) and testicular sperm extraction (TESE) on the microscopic morphology of the testis: An animal model / Y. Shufaro // *Hum. Reprod.* – 2002. – Vol. 17, № 7. – P. 1795-1799.
185. Silber, S.J. The effect of female age and ovarian reserve on pregnancy rate in male infertility: treatment of azoospermia with sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection / S.J. Silber // *Hum. Reprod.* – 1997. – Vol. 12, № – P. 2693-2700.
186. Simoni, M. Clinical consequences of microdeletions of the Y chromosome: the extended Münster experience / M. Simoni // *Reprod. Biomed. Online.* – 2008. – Vol. 16, № 2. – P. 289-303.
187. Soares, A.R. AZFb microdeletions and oligozoospermia – Which mechanisms? / A.R. Soares // *Fertil. Steril.* – 2012. – Vol. 97, № 4. – P. 858-863.
188. Sousa, M. Predictive value of testicular histology in secretory azoospermic subgroups and clinical outcome after microinjection of fresh and frozen-thawed sperm and spermatids / M. Sousa // *Hum. Reprod.* – 2002. – Vol. 17, № 7. – P. 1800-1810.
189. Su, L.M. Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection: Preoperative hystology can predict success of sperm retrieval / L.M. Su, G.D. Palermo, M. Goldstein // *J. Urol.* – 1999. – Vol. 161, № 1. – P. 112-130.
190. Takada, S. Androgen decline in patients with nonobstructive azoospermia after microdissection testicular sperm extraction / S. Takada // *Urology.* – 2008. – Vol. 72, № 1. – P. 114-118.
191. Talas, H. Outcome of repeated micro-surgical testicular sperm extraction in patients with non-obstructive azoospermia / H. Talas, O. Yaman, K. Aydos // *Asian J. Androl.* – 2007. – Vol. 9, № 5. – P. 668-673.

192. Tanaka, A. Ninety babies born after round spermatid injection into oocytes: survey of their development from fertilization to 2 years of age / A. Tanaka // *Fertil. Steril.* – 2018. – Vol. 110, № 3. – P. 443-451.
193. Thompson-Cree, M.E. Effects of cryopreservation on testicular sperm nuclear DNA fragmentation and its relationship with assisted conception outcome following ICSI with testicular spermatozoa / M.E. Thompson-Cree // *Reprod. Biomed. Online.* – 2003. – Vol. 7, № 4. – P. 449-455.
194. Tournaye, H. Are there any predictive factors for successful testicular sperm recovery in azoospermic patients? / H. Tournaye // *Hum. Reprod.* – 1997. – Vol. 12, № 1. – P. 80-86.
195. Tournaye, H. Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa / H. Tournaye // *Hum. Reprod.* – 1996. – Vol. 11, № 1. – P. 127-132.
196. Tournaye, H. No differences in outcome after intracytoplasmic sperm injection with fresh or with frozen-thawed epididymal spermatozoa / H. Tournaye // *Hum. Reprod.* – 1999. – Vol. 14, № 1. – P. 90-95.
197. Tsujimura, A. Conventional multiple or microdissection testicular sperm extraction: a comparative study / A. Tsujimura // *Hum. Reprod.* – 2002. – Vol. 17, № 11. – P. 2924-2929.
198. Tsujimura, A. Microdissection testicular sperm extraction: prediction, outcome, and complications / A. Tsujimura // *Int. J. Urol.* – 2007. – Vol. 14, № 10. – P. 883-889.
199. Tsujimura, A. Prediction of successful outcome of microdissection testicular sperm extraction in men with idiopathic nonobstructive azoospermia / A. Tsujimura // *J. Urol.* – 2004. – Vol. 172, № 5. – P. 1944-1947.
200. Tunc, L. Can serum Inhibin B and FSH levels, testicular histology and volume predict the outcome of testicular sperm extraction in patients with non-obstructive azoospermia? / L. Tunc // *Int. Urol. Nephrol.* – 2006. – Vol. 38, № 3. – P. 629-635.

201. Turek, P.J. Systematic fine-needle aspiration of the testis: correlation to biopsy and results of organ 'mapping' for mature sperm in azoospermic men / P.J. Turek, I. Cha, B.M. Ljung // *Urology*. – 1997. – Vol. 49, № 5. – P. 743-748.
202. Turunc, T. Conventional testicular sperm extraction combined with the microdissection technique in nonobstructive azoospermic patients: a prospective comparative study / T. Turunc // *Fertil. Steril.* – 2010. – Vol. 94, № 6. – P. 2157-2160.
203. Tyler-Smith, C. The will-o'-the-wisp of genetics – Hunting for the azoospermia factor gene / C. Tyler-Smith, C. Krausz // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – Vol. 360, № 9. – P. 925-927.
204. Ulug, U. Outcomes in couples undergoing ICSI: comparison between fresh and frozen-thawed surgically retrieved spermatozoa / U. Ulug // *Int. J. Androl.* – 2005. – Vol. 28, № 6. – P. 343-349.
205. Van, S.A. Results of intracytoplasmic sperm injection with ejaculated, fresh and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa / S.A. Van // *Hum. Reprod.* – 1998. – Vol. 13, № S1. – P. 134-142.
206. Verheyen, G. Quality of frozen-thawed testicular sperm and its preclinical use for intracytoplasmic sperm injection into in vitro-matured germinal-vesicle stage oocytes / G. Verheyen // *Fertil. Steril.* – 1997. – Vol. 67, № 1. – P. 74-80.
207. Vernaev, V. Can biological or clinical parameters predict testicular sperm recovery in 47,XXY Klinefelter's syndrome patients? / V. Vernaev // *Hum. Reprod.* – 2004. – Vol. 19, № – P. 1135-1139.
208. Vernaev, V. How successful is repeat testicular sperm extraction in patients with azoospermia? / V. Vernaev // *Hum. Reprod.* – 2006. – Vol. 21, № 6. – P.1551-1554.
209. Verza, S. Jr. Microsurgical versus conventional single – Biopsy testicular sperm extraction in nonobstructive azoospermia: a prospective controlled study / S. Verza Jr., S.C. Esteves // *Fertil. Steril.* – 2011. – Vol. 96, № S53.

210. Vicari, E. Epididymal and testicular sperm retrieval in azoospermic patients and the outcome of intracytoplasmic sperm injection in relation to the etiology of azoospermia / E. Vicari // *Fertil Steril.* – 2001. – Vol. 75, № 1. – P. 215-216.
211. Vloeberghs, V. Intracytoplasmic spermatid injection and in vitro maturation: fact or fiction? / V. Vloeberghs, G. Verheyen, H. Tournaye // *Clinics.* – 2013. – Vol. 68, № S1. – P. 151-156.
212. Vogt, P.H., Bender U. Human Y chromosome microdeletion analysis by PCR multiplex protocols identifying only clinically relevant AZF microdeletions / P.H. Vogt, U. Bender // *Methods Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 927. – P. 187-204.
213. Vozdova, M. Testicular sperm aneuploidy in non-obstructive azoospermic patients / M. Vozdova // *Hum. Reprod.* – 2012. – Vol. 27, № 7. – P. 2233-2239.
214. Weedon, J.W. Early versus late maturation arrest: reproductive outcomes of testicular failure / J.W. Weedon // *J. Urol.* – 2011. – Vol. 186, № 2. – P. 621-626.
215. Weedon, J.W. Varicocele repair in patients with nonobstructive azoospermia: a meta-analysis / J.W. Weedon, M. Khera, L.I. Lipshultz // *J. Urol.* – 2010. – Vol. 183, № 6. – P. 2309-2315.
216. Wood, S. Reproductive potential of fresh and cryopreserved epididymal and testicular spermatozoa in consecutive intracytoplasmic sperm injection cycles in the same patients / S. Wood // *Fertil. Steril.* – 2002. – Vol. 77, № 6. – P. 1162-1166.
217. Wu, Q. Prevalent false positives of azoospermia factor a (AZFa) microdeletions caused by single-nucleotide polymorphism rs72609647 in the sY84 screening of male infertility / Q. Wu // *Asian J. Androl.* – 2011. – Vol. 13, № 6. – P. 877-880.
218. Xu, T. Predictors for successful sperm retrieval of microdissection testicular sperm extraction (TESE) following failed TESE in nonobstructive azoospermia patients / T. Xu // *Andrologia.* – 2017. – Vol. 49, № 4. – P. e12642.
219. Yang, J. Sperm retrieval and the predictive parameter of non-obstructive azoospermia: a meta-analysis of literatures 1990 to 2008 / J. Yang // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* – 2008. – Vol. 88, № 30. – P. 2131-2135.

220. Yildirim, M.E. The association between serum follicle-stimulating hormone levels and the success of microdissection testicular sperm extraction in patients with azoospermia / M.E. Yildirim // Urol. J. – 2014. – Vol. 11, № 4. – P. 1825-1828.
221. Yücel, C. Predictive factors of successful salvage microdissection testicular sperm extraction (mTESE) after failed mTESE in patients with non-obstructive azoospermia: Long-term experience at a single institute / C. Yücel // Arch. Ital. Urol. Androl. – 2018. – Vol. 90, № 2. – P. 136-140.
222. Ziaee, S.A. Prediction of successful sperm retrieval in patients with nonobstructive azoospermia / S.A. Ziaee // Urol. J. – 2006. – Vol. 3, № 2. – P. 92-96.