

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии»

На правах рукописи

Витязева Ирина Ивановна

**Инновационные технологии в персонализированной диагностике и
лечении инфертильных мужчин с эндокринопатиями и тяжелыми
нарушениями сперматогенеза**

14.01.02 – Эндокринология

Диссертация

на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
академик РАН, профессор, д.м.н. И.И.ДЕДОВ

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. Современные представления об этиологии, патогенезе, диагностике, инновационных технологиях в лечении инфертильных мужчин с эндокринопатиями и тяжелыми нарушениями сперматогенеза.....	45
1.1 Этиопатогенетические и клинико-диагностические аспекты мужского бесплодия при азооспермии	45
1.2 Диагностика типов азооспермии	49
1.2.1 Электронно-микроскопическое исследование сперматозоидов.....	50
1.2.2 Исследование синаптонемных комплексов сперматоцитов I порядка мужчин с азооспермией.....	52
1.3 Влияние избыточной массы тела и ожирения на мужскую фертильность. Методы исследования фертильности при эндокринопатиях и тяжелых нарушениях сперматогенеза.....	53
1.3.1 Оценка функциональной зрелости сперматозоидов при первичном исследовании эякулята	55
1.4 Методы обнаружения сперматозоидов при азооспермии.....	56
1.4.1 Критерии успеха инвазивных манипуляций на яичках. Прогноз получения сперматозоидов до операции.....	59
1.4.2 Предоперационная гормональная терапия.....	64
1.5 Исходы программ ЭКО-ИКСИ при мужском факторе бесплодия, обусловленном разными типами азооспермий	66
ГЛАВА 2. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННЫХ МУЖЧИН С АЗООСПЕРМИЕЙ	70
2.1 Динамика спермиологических показателей бесплодных мужчин, обратившихся в отделение ВРТ в период 2009 – 2016 гг.	70
2.2 Клиническая характеристика обследованных мужчин с азооспермией.....	71

ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛАБОРАТОРНО-ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ МУЖЧИН С АЗООСПЕРМИЕЙ	88
3.1 Результаты гормонального скрининга.....	88
3.2 Результаты микробиологического исследования.....	94
3.3 Результаты молекулярно-генетического исследования.....	97
3.4 Результаты использования различных методов экстракции сперматозоидов.....	105
3.5 Результаты гистологического исследования биоптатов гонад	107
3.5.1 Результаты гистологического исследования материала яичек в зависимости от наличия и типов генетических полиморфизмов	119
3.6 Результаты электронно-микроскопического исследования сперматозоидов	122
3.7 Результаты цитогенетического исследования синаптонемных комплексов сперматоцитов I порядка.....	135
3.8 Предикторы экстракции сперматозоидов при азооспермии	157
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА ЗДОРОВЬЯ МУЖЧИН С СИНДРОМОМ КЛЯЙНФЕЛЬТЕРА	175
ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ БЕСПЛОДНЫХ МУЖЧИН С ИЗБЫТОЧНОЙ МАССОЙ ТЕЛА И ОЖИРЕНИЕМ	186
5.1 Клиническая характеристика мужчин с избыточной массой тела и ожирением	186
5.2 Спермиологические характеристики бесплодных мужчин с различным индексом массы тела (ИМТ)	189
5.2.1 Влияние ИМТ на ультраструктуры сперматозоидов	191
5.3 Результаты исследования фрагментации ДНК сперматозоидов бесплодных мужчин с различным ИМТ	196
5.4 Функциональная зрелость сперматозоидов при первичной	

оценке эякулята у бесплодных мужчин с различным ИМТ	197
ГЛАВА 6. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ И РЕАБИЛИТАЦИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ МУЖЧИН С ЭНДОКРИНОПАТИЯМИ И ТЯЖЕЛЫМИ НАРУШЕНИЯМИ СПЕРМАТОГЕНЕЗА МЕТОДАМИ ВРТ	205
6.1 Эффективность лечения различных типов азооспермии	205
6.1.1 Исходы различных методик получения сперматозоидов у мужчин с азооспермией, эффективность ВРТ	205
6.1.2 Влияние носительства мутаций AZF региона Y-хромосомы, полиморфизмов генов <i>CFTR</i> и <i>AR</i> на ультраструктурные параметры сперматозоидов и связь с частотой наступления беременности	226
6.2 Исходы лечения бесплодия методами ВРТ мужчин с различным ИМТ	234
ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	243
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	268
ВЫВОДЫ.....	275
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	278
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	281
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	284

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Тенденция к снижению рождаемости в развитых странах мира за последние десятилетия способствовала интенсификации мероприятий, направленных на охрану репродуктивного здоровья мужчин и женщин, включая новые высокотехнологичные методы лечения. При высокой частоте бесплодных браков (15%), в России зарегистрировано более 5 млн супружеских пар, из которых 2 млн нуждаются в современных инновационных технологиях, основанных на оплодотворении *in vitro* (экстракорпоральное оплодотворение, ЭКО)[21,22,32].

Мужской фактор входит в структуру бесплодного брака и варьирует в пределах 30–50% [186]. Азооспермия – тяжелая форма патозооспермии (у 1% мужчин в популяции и 10-15% с бесплодием) ввиду отсутствия сперматозоидов в эякуляте [112,238]. Различают азооспермию обструктивную – инкреторную (ОА, 40%), необструктивную – секреторную (НОА, 60%) и их сочетание [128].

Решение проблемы мужского бесплодия (МБ) сопряжено с трудностями выяснения генеза выраженного угнетения и блока сперматогенеза, дисморфогенеза гамет и их фертилизационных свойств [50]. Отсутствие четких представлений об этиологии и патогенезе отдельных форм МБ объясняет низкую эффективность лечебно-диагностических подходов, повышение которой требует дополнения рутинного объема исследований специфическими.

Значимость генетических факторов в генезе азооспермии (геномные – нарушение численности хромосомного набора и постгеномные: полиморфизмы генов муковисцидоза (трансмембранного регуляторного белка, *CFTR* - Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), мутации генов *AZF* (Azoospermia Factor, фактор азооспермии) региона Y-хромосомы и полиморфизмы *SAG*-повторов гена андрогенового рецептора (*AR*)) активно дискутируется [34,37,58,286].

Исследования в области цитогенетики и молекулярной генетики позволили дополнить общеизвестные причины нарушения созревания или отсутствия

сперматозоидов в ткани яичка контраверсионными. Роль структурных и числовых хромосомных аномалий (ХА) – до 6% в генезе МБ и 15% – азооспермии, как и мутации в AZF регионе Y-хромосомы активно обсуждаются в контексте причин тестикулярной недостаточности при НОА [73,82,83,194].

Наиболее тяжелой формой первичного гипергонадотропного гипогонадизма является немозаичная форма (47,XXY) синдрома Клайнфельтера (СК), которая диагностируется у 10-12% мужчин с азооспермией. Дискутабельность тактики ведения больных с СК обусловлена теоретической возможностью их генетического отцовства с практическим обсуждением условий, способствующих данной реализации [66,271,304].

Неоднозначность данных о взаимосвязи AZF-микроделеций Y-хромосомы с инфертильностью мужчин (в популяции один случай на 1500–3000) объясняется характером повреждений в регионах AZFa, AZFb и AZFc, с редкой (5%) и пагубно влияющей на сперматогенез делецией («выпадением») AZFa-зоны [36].

Нарушение инкреторной функции при ОА препятствует попаданию сперматозоидов в эякулят при непроходимости участка/ов семявыносящих протоков после урогенитальных инфекций, травм и операций на органах мошонки, генетически обусловленных синдромах (муковисцидоз)[115,152]. Обсуждается целесообразность генетического тестирования когорты мужчин с азооспермией, преимущественно с ОА на наличие мутаций гена муковисцидоза (*CFTR*) как причины врожденного отсутствия семявыносящих протоков или их непроходимости [38].

Понимание сути сперматогенеза как многоэтапного процесса, контролируемого каскадом генов, с индукцией пролиферации сперматогониев, инициации и завершения делений мейоза, дифференцировки сперматид в сперматозоиды (спермиогенез) привело к решению о необходимости расширения спектра обследований при азооспермии. Этому способствовали успехи современной молекулярной биологии – геномики, протеомики и транскриптомных технологий с уточнением механизмов нарушения белково-

генных взаимодействий. Потребность в реализации отцовства и исключении передачи потомству дефектов морфологически «нормальных» сперматозоидов в программах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) с применением микрохирургической техники интрацитоплазматической инъекции единичного сперматозоида (ИКСИ, IntraCytoplasmic Sperm Injection (ICSI)) снижают значимость традиционной тактики ведения больных с азооспермией и указывают на необходимость применения инновационных диагностических методов – цито- и молекулярно-генетического скрининга.

Эпидемиологические исследования подтверждают высокую обращаемость к репродуктологам супружеских пар с избытком массы тела у партнера с мужским фактором бесплодия [192]. Рост числа мужчин с ожирением способствовал поиску механизмов негативного влияния последнего на семиологические параметры эякулята [22,55].

Степень разработанности темы.

Отсутствие регламентации использования молекулярно-генетических тестов при МБ объясняется неоднозначностью данных об их патогенетической значимости [132,163,212]. Противоречивость влияния на сперматогенез и фертильность мужчин полных и частичных AZFc-делеций (gr/gr, b1/b3, b2/b3, b3/b4 и др.) связывают с гетерогенностью исследуемых выборок – географической и этнической [72,93,145,214].

Активно обсуждается обусловленность «фенотипа» сперматогенеза генотипом – взаимосвязи микроделеций субрегионов AZFa и AZFb с развитием Сертоли клеточного синдрома (СКС) и мозаичности нарушений созревания сперматозоидов при частичных «выпадениях» с позиций прогностической ценности их тестирования [98,293].

Возможности расширения диапазона исследований при азооспермии доказывают результаты количественного электронно-микроскопического исследования сперматозоидов (ЭМИС), позволяющего связать не визуализируемую при световой микроскопии и отрицательных функциональных тестах дезорганизацию ультраструктур гамет (целостность

ДНК, степень компактизации хроматина и пр.) с эффективностью реализации репродуктивной функции [8,20,26].

Единичные данные о роли синаптонемных комплексов (СинК) в ядрах сперматоцитов I порядка (аномалии конъюгации, рекомбинации и десинапсиса гомологичных хромосом в профазе I мейоза) в генезе снижения мужской фертильности подтверждают значимость оценки рисков передачи потомству дефектов спермиогенеза при инактивации защитных механизмов селекции гамет [103,191]. Влияние микроделений субрегионов Y-хромосомы – AZFa, AZFb и AZFc и ХА на состояние СинК практически не изучено.

Перспективным направлением оценки нарушений сперматогенеза считают тест на связываемость спермиев с гиалуроновой кислотой (НВА-тест, Sperm-Hyaluronan Binding Assay) [239]. Немногочисленность данных о корреляции удельного веса связываемых с гиалуронатом спермиев как маркера фрагментации ДНК делают дискуссионным применение теста до вступления в программы вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) и влияния его результатов на выбор методов оплодотворения – ЭКО или ИКСИ [223].

Эффективность методик извлечения сперматозоидов из тестикулярной ткани при азооспермии остается предметом дискуссий [97,129,227]. Данные о сохранности отдельных очагов сперматогенеза при НОА указывают на возможность лечения бесплодия и в этих случаях. Минимизацию повреждений ткани яичек, усугубляющих тяжесть гипогонадизма, связывают с микрохирургическим методом экстракции гамет (микро-ТЕСЕ), оптимальным для выявления очагов сперматогенеза и извлечения зрелых сперматид не только при НОА, но и при СКС [105]. Метод обеспечивает наименьший объем извлекаемой ткани яичка. Оспаривается приоритет какого-либо из методов извлечения сперматозоидов. Предварительная диагностическая биопсия яичек не позволяет прогнозировать успешность последующих извлечений в 15-20% случаев [112,229].

Данные о частоте извлечения сперматозоидов (ЧИС, sperm retrieval rate, SRR) варьируют: при НОА – до 50%, ОА – 100%, СК – в пределах 28-69%, несмотря на тяжелую тестикулярную дегенерацию [112,150,236,251].

Подобный диапазон объясняется противоречивостью данных об эффективности в качестве предикторов «остаточного» сперматогенеза параметров: объема яичек, уровня гипофизарных гормонов, тестостерона, ингибина В и антимюллерова гормона (АМГ)[129,162,209,221,248,250]. Обсуждается коррелятивность микроделеций Y-хромосомы с исходом манипуляций: наличие «полного выпадения» субрегиона AZFa считают маркером блока созревания сперматозоидов, «частичные» – связывают с мозаицизмом гистогенеза [198].

Вопрос целесообразности извлечения тестикулярных сперматозоидов при азооспермии определяет заключение о возможности иметь генетически родного ребенка в исходе программы ЭКО-ИКСИ только одному из семи мужчин (13,4%)[168]. Данные о реализации фертильности при СК объясняют сохранностью фокусного сперматогенеза и ploидности сперматогенных клеток на фоне обширного фиброза и гиалинизации семенных канальцев. Прогноз успешной экстракции сперматозоидов при СК связывают с андрогензаместительной терапией с пубертатного возраста. В отношении «ранней» экстракции гамет и криоконсервации для отсроченной реализации репродуктивной функции мнения неоднозначны [134,176,212,243].

Противоречивость данных о корреляции фрагментации ДНК со снижением оплодотворяющей способности, дефектами эмбриогенеза в пре- и постимплантационном периодах и ранними репродуктивными потерями не позволяет сделать вывод о значимости теста для оценки потенциала мужской фертильности [35,67,285,291]. По результатам мета-анализа, целесообразность изучения целостности ДНК сперматозоидов как предиктора исходов программ ЭКО-ИКСИ не доказана [262].

Обсуждается вопрос: существует ли связь между индексом массы тела (ИМТ) и параметрами эякулята взрослых мужчин? По некоторым данным,

избыточная масса тела и ожирение отрицательно влияют на морфологию гамет и уровень тестостерона [234]. Сообщается о низких показателях частоты наступления беременности (ЧНБ) в протоколах с ИКСИ от мужчин с ожирением (на 84% меньше, чем нормальном ИМТ) [71,205,281]. Анализ воздействия ожирения мужчин на деторождение позволит оптимизировать тактику лечения в соответствующих случаях [275].

Данные о высокой частоте ХА эмбриона при тяжелых формах патозооспермии обосновывают необходимость оценки подобных рисков и преимплантационной генетической диагностики (ПГД) эмбрионов [449,466]. Отсутствие фундаментальных исследований по вопросам преодоления бесплодия при азооспермии и пошаговой реабилитации репродуктивной функции – от получения тестикулярных сперматозоидов до наступления беременности и рождения здорового потомства и явилось основанием для проведения настоящей работы.

Цель исследования:

Изучить возможности современных инновационных технологий, основанных на оплодотворении *in vitro*, в повышении эффективности и безопасности персонализированной репродуктивной реабилитации мужчин с азооспермией различного генеза и нарушениями сперматогенеза при ожирении.

Задачи исследования:

1. Оценить характер гипоталамо-гипофизарной регуляции и частоту нарушений сперматогенеза (патозооспермия, азооспермия) как причину мужского бесплодия в структуре бесплодного брака.
2. Определить влияние генетических аномалий, полиморфизмов генов *CFTR*, *AR*, делеций в *AZF*_{a,b,c} локусах Y-хромосомы на репродуктивную функцию мужчин с различными типами азооспермии.
3. Выявить особенности нарушений сперматогенеза на геномном и постгеномном уровнях, используя патоморфологические, электронно-микроскопические и иммуноцитогенетические методы исследования по оценке

синаптонемных комплексов сперматоцитов I порядка биоптатов тестикулярной ткани.

4. Оценить эндокринно-метаболический статус мужчин с избыточной массой тела и ожирением, взаимосвязь его особенностей с ультраструктурными изменениями сперматозоидов и макроскопическими параметрами эякулята, их влияние на эффективность программ ЭКО-ИКСИ.

5. Определить прогностическую значимость физикальных, гормонально-метаболических факторов для оценки сперматогенеза и возможного извлечения тестикулярных сперматозоидов при немозаичной форме синдрома Кляйнфельтера.

6. Разработать оптимальный метод и определить прогностические критерии успешного извлечения сперматозоидов при азооспермии различного генеза.

7. Установить частоту оплодотворения, имплантации, наступления и вынашивания беременности, ранних репродуктивных потерь в супружеских парах с различными формами азооспермии, избыточной массой тела и ожирением мужчин.

8. Разработать и оценить эффективность алгоритмов диагностики тяжелого нарушения сперматогенеза на основании клинико-лабораторных, патоморфологических, иммуноцитохимических, геномных и постгеномных методов исследования с учетом метода извлечения тестикулярных/эпидидимальных сперматозоидов при азооспермии; репродуктивной функции мужчин при избыточной массе тела и ожирении.

Научная новизна. Получены новые факты и сформулирована концепция, существенно дополняющая представления об этиологии, патогенезе и диагностике типов азооспермии, и способах преодоления тяжелых форм мужского бесплодия.

Обоснована патогенетическая модель организации тяжелых нарушений сперматогенеза, доказывающая многоуровневость поломок сперматогенеза, с

учетом комплексного диагностического подхода, предусматривающего дополнение традиционных методов исследования специфическими. Установлена роль генетических нарушений в генезе азооспермии (цитогенетическое и молекулярно-генетическое тестирование) и особенности сперматогенеза при различных типах AZF делеций, носительстве мутантных полиморфизмов генов *CFTR* и *AR*.

Определены патогенетически значимые механизмы тяжелых нарушений сперматогенеза – от макроповреждений (тканевого) до ультраструктурных и молекулярно-клеточных с использованием патоморфологического, электронно-микроскопического исследований и иммуноцитохимического анализа синаптонемных комплексов сперматоцитов I порядка.

Доказана целесообразность включения в алгоритм обследования мужчин с азооспермией тестов для оценки рисков наследования нарушений сперматогенеза на геномном и постгеномном уровнях. Установлено, что операция микро-ТЕСЕ при немозаичной форме СК является методологией экстракции сперматозоидов, пригодных для оплодотворения в программах ЭКО-ИКСИ, более результативной в молодом возрасте.

Показано, что эффективность тестикулярной экстракции сперматозоидов при азооспермии определяется суммой факторов, характеризующих эндокринно-метаболический статус мужчин и ультраструктурные особенности гамет. Установлена взаимосвязь нарушений фертильного потенциала мужчин с избыточной массой тела (ИзбМТ) и ожирением на основании изучения макро- и ультраструктурных особенностей сперматозоидов, оценки морфологической целостности ДНК – индекса фрагментации. Выверены дискриминационные параметры спермограммы, обосновывающие дополнение комплекса обследования мужчин с патозооспермией НВА-тестом. Доказана значимость молекулярно-биологических предикторов эффективности получения сперматозоидов для персонализации тактики ведения мужчин с азооспермией.

Теоретическая и практическая значимость

Показана эффективность введения в алгоритм обследования мужчин с азооспермией методов ультраструктурной оценки сперматогенеза. Обоснована эффективность мультифокальной микродиссекции тестикулярной ткани как наиболее эффективного и технически щадящего метода экстракции сперматозоидов и оценки состояния сперматогенеза.

Установлена информативность исследований при азооспермии на геномном и постгеномном уровнях для оценки рисков процедуры ИКСИ, необходимости ПГД и выбора метода оптимальной реализации репродуктивной функции.

Разработаны практические рекомендации по реализации программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) у мужчин с СК. Разработан и внедрен алгоритм обследования и ведения мужчин с различными типами азооспермии, патозооспермией при избыточной массе тела и ожирении. Показано, что персонификация подходов к репродуктивной реабилитации мужчин с нарушениями сперматогенеза повышает эффективность программ ВРТ, обеспечивая рождение здорового потомства, даже без использования донорской спермы.

Методология и методы исследования

Когортное проспективное исследование проводилось в период с 2009 по 2016гг. в отделении ВРТ ФГБУ НМИЦ Эндокринологии МЗ РФ (директор – академик РАН И.И. Дедов.) Выборка супружеских пар с бесплодием (мужским и сочетанным фактором) (n=905) отобрана в исследование в соответствии с разработанными критериями включения и исключения в рамках программ ЭКО и ЭКО-ИКСИ на основании Приложения №2 Приказа №107н Минздрава России от 30 августа 2012г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

Критерии включения:

I-й блок исследования - супружеские пары с тяжелым мужским фактором (азооспермия, криптозооспермия) или сочетанным с женским фактором бесплодия. При проведении 4655 спермограмм выявлено 339 мужчин с азооспермией, что составило 7,3%, в программу ЭКО-ИКСИ с получением тестискулярных сперматозоидов было включено 260.

II-й блок исследования – бесплодные супружеские пары с мужским фактором – представители с различным ИМТ (нормовесные, с ИзбМТ, ожирением), с нормо- и патозооспермией (n=645).

Получены информированные добровольные согласия всех пациентов на участие в обследовании и лечении, в том числе на манипуляции по извлечению сперматозоидов из придатка и/или ткани яичка (ПЕСА, ТЕСЕ, микро-ТЕСЕ).

Критерии исключения для мужчин: злокачественные новообразования; острые воспалительные процессы уrogenитального тракта, лейкоспермия по данным лейкосперм-теста при тяжелых формах патозооспермии, психические и экстрагенитальные заболевания в стадии декомпенсации.

Исследовательская работа была одобрена этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

Научно-статистическая программа исследования включала сбор материала с учетом критериев включения и исключения и регистрацию данных медицинской документации, математико-статистическую обработку полученных данных, анализ и их обобщение.

В соответствии с целью и задачами исследования использовали клинико-анамнестические и лабораторно-инструментальные методы диагностики.

В Таблице 1.1 представлен перечень использованных в работе методов и объем исследований.

Таблица 1.1 — Методы и объем выполненных исследований

Методы исследований	Количество пациентов
Клинико-anamнестический	905
Спермиологическое исследование	905 x 2
Трансректальное ультразвуковое исследование (ТРУЗИ) простаты, сонография и доплерография органов мошонки	905
Гормональное исследование (иммуноферментный анализ)	905
Микробиологическое исследование (эякулята, секрета простаты; инфекции, передаваемые половым путем методом ПЦР отделяемого из уретры)	485
Морфологическое исследование биоптатов тестикул	209
Кариотипирование мужчин (цитогенетика) и молекулярно-генетическое исследование	260
Электронно-микроскопическое исследование тестикулярной ткани (сперматозоидов)	77
Цитогенетическое исследование синаптонемных комплексов распластанных ядер сперматозитов I порядка	77
Исследование фрагментации ДНК сперматозоидов у мужчин с различным индексом массы тела	281
Оценка связываемости сперматозоидов с гиалуронатом с помощью НВА–теста	185

На основании результатов спермиологического исследования эякулята и патоморфологического анализа биоптатов яичек бесплодных мужчин были сформированы следующие группы.

Дизайн исследования представлен двумя блоками (Рисунок 1.1):



Рисунок 1.1— I-й блок исследования.

Первый блок исследований (N=260):

I – обструктивная азооспермия (ОА) (n=76);

II – необструктивная азооспермия (НОА) (n=105);

III – смешанная азооспермия (ОА+НОА) (n=79).

В первый блок вошли 6 человек с немозаичной формой синдрома Кляйнфельтера, результаты комплексного обследования которых представлены в Главе 4.

В первом блоке оценивали генез азооспермии, степень нарушений репродуктивной функции и влияющие на нее факторы, с выделением предикторов эффективности тестикулярной экстракции сперматозоидов и результативности используемых технологий лечения.

Второй блок исследований (N=645) включал бесплодных мужчин, которые были сгруппированы в зависимости от ИМТ (Рисунок 1.2):

- нормовесные (ИМТ=18-24,9 кг/м², n=202),

- с избыточной массой тела (ИМТ=25-29,9 кг/м², n=307),

- ожирением (ИМТ≥30 кг/м², n=136).

В рамках блока проведены специфические исследования: расчет индекса фрагментации (ИФ) ДНК сперматозоидов и связывания сперматозоидов с гиалуронатом (произвольный выбор претендентов).

ИФ ДНК сперматозоидов определяли: у 88 бесплодных мужчин с нормальным ИМТ, 141 – ИзбМТ и 52 – ожирением.

Оценку связывания сперматозоидов с гиалуронатом с помощью НВА-теста проводили у мужчин с различным состоянием сперматогенеза: с нормозооспермией (n=99) и патозооспермией (n=86), ИМТ которых варьировал внутри групп.

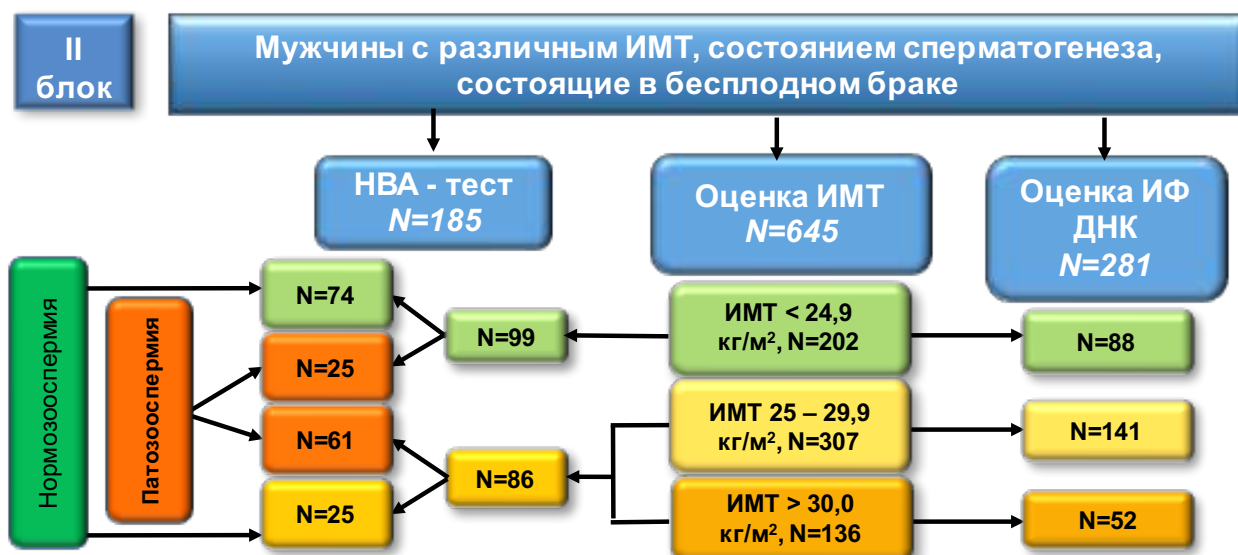


Рисунок 1.2 — Дизайн обследования бесплодных мужчин с различным ИМТ на II-м этапе.

Результатом анализа репродуктивного потенциала мужчин с ИзбМТ и ожирением, а также спермиологических параметров на макро- и ультраструктурном уровне явилась оптимизация алгоритма ведения, предусматривающая включение в комплекс обследования специфических тестов (ИФ ДНК сперматозоидов, связывание их с гиалуронатом (НВА-тест)).

Итогом стала разработка патогенетической модели нарушений сперматогенеза при азооспермии и патозооспермии. Определена эффективность персонализированных лечебно-диагностических подходов при различных типах азооспермии с учетом «многоуровневости» повреждений (макро- и ультраструктурных) и дифференциацией тактики лечения в зависимости от выявленных рисков передачи патологии генетического материала потомству.

Обследование мужчин проводили согласно стандартизированному протоколу обследования бесплодной пары (ВОЗ, 2010) с занесением данных в

разработанную индивидуальную карту. Дополнительную информацию получали из амбулаторных карт (форма №025/у) и историй болезни стационарного больного (форма №003/у).

Оценивали приверженность токсикантам: потребление алкоголя (эпизодическое – до раза в неделю, более одного раза), курение (до пачки в день, более пачки).

Объем обследования при патозооспермии включал: клинический осмотр и сбор анамнеза, выяснение фактов инфекционных, соматических заболеваний, особенностей уро-андрологического статуса, перенесенных травм и хирургических вмешательств на мочеполовых органах, уточнение типа бесплодия, наличия и результатов предыдущего обследования и лечения андрологами. При наружном осмотре оценивали общефизическое развитие, тип телосложения, ИМТ и степень вирилизации по Таннеру (Tanner J.M. et al., 1966), наличие гинекомастии, измеряли окружность талии и бедер.

Специальное андрологическое исследование включало пальпаторное обследование, оценку размеров и состояния яичек и их придатков, семявыносящих протоков, полового члена, предстательной железы и семенных пузырьков. Объем яичек определяли при помощи орхидометра Прадера (норма - более 15 см³; 3-15 см³ - гипотрофия, менее 3 см³ – гипоплазия, ≤1 см³ – атрофия). Гипогонадизм диагностировали при наличии клинических симптомов, ассоциированных с дефицитом андрогенов, и выявлении стойкого снижения уровня тестостерона (как минимум, двукратно подтвержденного).

Экстрагенитальные заболевания выявляли при изучении анамнеза в совокупности с лабораторно-инструментальными методами исследования.

Спермограмма. При анализе эякулята (стандартные критерии спермиологического исследования, согласно «Руководству ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека», 2010г.; микроскоп Olympus CX31, Япония) оценивали объем, цвет, консистенцию, рН, концентрацию сперматозоидов и их общее количество; степень подвижности по трем категориям – прогрессивная подвижность, непрогрессивная подвижность и

неподвижные гаметы; жизнеспособность; наличие агглютинации; подсчет круглых клеток. Оценку морфологии сперматозоидов проводили по строгим критериям Крюгера на предокрашенных стеклах Prestained Morphology Slides (Cell-vu, США). Определяли индекс тератозооспермии (ИТ, %), который отражал среднее число структурных изменений на один сперматозоид и рассчитывался по формуле: сумма дефектов морфологических частей сперматозоида на число спермиев с патологической структурой из расчета на 100 гамет. Азооспермия подтверждена минимум двукратным исследованием эякулята (Таблица 1.2).

Таблица 1.2 — Минимальные референсные значения показателей эякулята (5-й процентиль и 95%-й доверительный интервал) ВОЗ, 2010г.

Показатель	Минимальное референсное значение
Объем эякулята (мл)	1,5 (1,4–1,7)
Общее количество сперматозоидов в эякуляте (10^6 на эякулят)	39 (33–46)
Концентрация сперматозоидов (10^6 на мл)	15 (12–16)
Общая подвижность (PR+NP, %)	40 (38–42)
Прогрессивно подвижные (PR, %)	32 (31–34)
Жизнеспособность (живые сперматозоиды, %)	58 (55–63)
Морфология сперматозоидов (нормальные формы, %)	4 (3,0–4,0)
Остальные показатели эякулята	
pH	$\geq 7,2$
Пероксидаза-положительные лейкоциты (10^6 на мл)	$< 1,0$
MAR-тест (подвижные сперматозоиды со связанными шариками, %)	< 50
Тест с иммунными шариками (подвижные сперматозоиды со связанными шариками, %)	< 50
Содержание фруктозы в семенной плазме (ммоль/эякулят)	≥ 13
Содержание нейтральной α -гликозидазы в семенной плазме (мЕд/эякулят)	≥ 20
Содержание цитрата в семенной плазме (ммоль/эякулят)	$> 6,8$ мг/эяк

Оценка ИФ ДНК сперматозоидов. Использовали 1,0 мл разжиженного эякулята, который центрифугировали с 9,0 мл физиологического раствора в течение 20 мин при скорости 300g. Надосадочную жидкость удаляли, из суспендированного осадка делали мазок, который после высушивания на воздухе в течение 10 мин при комнатной температуре 24-25°C погружали в раствор метанол-уксусной кислоты в соотношении 3:1 на 5 мин. Высушенный

фиксированный мазок окрашивали акридином оранжевым (АО) в течение 3 мин. Затем препарат промывали дистиллированной водой и обезвоживали в течение одной мин в 70% растворе этанола. После высушивания препарата производили оценку ИФ ДНК. Под воздействием ультрафиолетового излучения АО флуоресцирует зеленым светом при связывании с двухцепочечной ДНК, красным - в сперматозоидах с денатурированной, одноцепочечной ДНК. Для визуализации сперматозоидов использовали флуоресцентный микроскоп Olympus BX51 (Япония) с 600-кратным увеличением.

Подсчет ИФ ДНК проводили по формуле: число сперматозоидов с фрагментированной ДНК, поделенное на 100 проанализированных клеток (до 30% - низкий; $\geq 30\%$ - высокий).

Проба с гиалуроновой кислотой при помощи НВА теста (hyaluronate-binding assay). Тест основан на связывании зрелых сперматозоидов с гиалуронатом — основным компонентом кумулюсного комплекса яйцеклеток. Связывание свидетельствует о завершении этапов сперматогенеза, высокой степени зрелости хроматина, низкой частоте хромосомных аномалий и одноцепочечных разрывов ДНК. Это важнейший критерий удачного оплодотворения и получения эмбрионов высокого качества, развивающихся до стадии бластоцисты (5 сутки). По результатам теста осуществляется выбор метода оплодотворения: при низком уровне связывания сперматозоидов с гиалуронатом используют ИКСИ, при высоком — инсеминацию (оплодотворение) ооцитов *in vitro*.

Методика: в центр капли сухого гиалуроната дозатором наносят 5-7 мкл эякулята и накрывают покровным стеклом, чтобы избежать образования пузырьков воздуха. Подсчет проводят спустя 5-10 мин после нанесения эякулята. Процент зрелых сперматозоидов — это количество связавшихся сперматозоидов с гиалуронатом, разделенное на сумму связавшихся и подвижных сперматозоидов. Количество неподвижных сперматозоидов не принимается во внимание.

$$\% = \frac{\text{количество связавшихся с гиалуронатом сперматозоидов}}{\text{кол-во связавшихся} + \text{кол-во подвижных сперматозоидов}}$$

Нормальными показателями считали 65% и выше (показатели нашей эмбриологической лаборатории; согласно работе K.Worrillow, 2013; по инструкции производителя - 80%). Исследование проводилось в отделении ВРТ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» МЗ России ст.н.с. Мун Т.В., н.с Разиной О.Ю., н.с. Лютым Р.Ю.

Гормональный скрининг включал оценку уровней лютеинизирующего гормона (ЛГ), фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), пролактина (ПРЛ), ингибина В, общего тестостерона (Тест_{общ}), свободного (Тест_{своб}) и биодоступного (Тест_{био}), эстрадиола (Е₂), глобулина, связывающего половые гормоны (ГСПГ) (иммунохимический анализатор Vitros 3600, Ortho-Clinical Diagnostics (Johnson & Johnson company, США), метод усиленной хемилюминесценции). Исследование тиреотропного гормона (ТТГ), тироксина свободного (свТ₄), трийодтиронина (свТ₃), аутоантител к тиреопероксидазе (АТ-ТПО) проводили на автоматическом иммунохемилюминесцентном анализаторе Architect i2000sr (Abbott). Уровень ингибина В и антимюллерова гормона (АМГ) в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа (ELISA) на анализаторе Victor (Perkin Elmer). Биохимические исследования крови и мочи выполняли на автоматическом биохимическом анализаторе Architect 8000 (Abbott). База исследований: клиническая лаборатория ФГБУ НМИЦ эндокринологии МЗ России.

Биохимическое исследование крови (определение в сыворотке крови уровней глюкозы, общего холестерина (ХС), ХС липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), ХС липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), триглицеридов (ТГ)), глюкозы и иммунореактивного инсулина (ИРИ) проводили на автоматическом биохимическом анализаторе Archotect 8000 (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, США) стандартными наборами фирмы.

Биохимическое исследование эякулята (Эпискрин плюс - FertiPro, Бельгия): Наличие лимонной кислоты определяли фотометрическим методом с

помощью Citric Acid Test, насыщенность цвета - фотометром Anthos 2020, Австрия (фильтр для цитрата 405 нм). Количество фруктозы в семенной плазме, отражающей секреторную функцию семенных пузырьков, оценивали при помощи Fructose Test фотометрическим методом с фильтром 470-492 нм. (норма по ВОЗ - 2,4 мг/эякулят (13 ммоль/эякулят) и более). Активность α -гликозидазы в семенной плазме мужчин с азооспермией является специфическим маркером секреторной функции придатков яичек (спектрофотометрия с фильтром 405 нм). Исследования выполнены в клинической лаборатории Центра Иммунологии и Репродукции, Москва.

Инфекционный скрининг включал анализ отделяемого из уретры, бактериологическое исследование спермы и/или секрета простаты, оценку видового и количественного состава микрофлоры мочеполового тракта мужчины. Проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) диагностику инфекций, передаваемых половым путем (ИППП)(хламидий, трихомонад, вируса простого герпеса 2 типа (ВПГ-2) и цитомегаловируса (ЦМВ)), с использованием наборов реагентов «ДНК-технологии» на оборудовании ДНК-Технология ДТпрайм (Россия). Количественно оценивали титр условных патогенов (микоплазм, уреаплазм, гарднерелл); диагностически значимым считался показатель $>10^4$ КОЕ/мл.

С целью исключения инфекции мочеполового тракта проводили определение лейкоцитов в эякуляте при помощи набора Лейкоскрин FertPro (Бельгия). В соответствии с нормативами (ВОЗ, 2010), при отклонении параметров от пороговых значений (количество лейкоцитов в семенной плазме более 1,0 млн/мл) выполняли микробиологическое исследование эякулята.

База исследований - бактериологическое отделение Лаборатории ДиаЛаб (зав. отделением В.С.Салькова).

Трансректальное ультразвуковое исследование (ТРУЗИ) с оценкой состояния предстательной железы, семенных пузырьков, сонографию и доплерографию органов мошонки - яичек и их придатков (с определением объема) проводили в отделении ВРТ ФГБУ НМИЦ на аппарате Logiq 3 General

Electric (США) (в.н.с., к.м.н. С.В.Боголюбов, зав. отделением ВРТ, к.м.н. И.И.Витязева).

Медико-генетическое исследование. С целью исключения генетически обусловленных причин тяжелых форм патозооспермии и азооспермии выполняли: цитогенетическое (кариотип) и молекулярно-генетическое исследование (микроделеции в AZF локусе Y- хромосомы (AZF-a, AZF-b, AZF-c); генов *CFTR* и *AR*) в ФГБНУ «Медико-генетический научный центр».

Цитогенетическое исследование (кариотип) проводили по стандартной методике на культивированных (72 час) лимфоцитах периферической крови с использованием дифференциальных методов GTG- и C-окрашивания с оценкой по критериям Международной номенклатуры цитогенетики человека (ISCN, 2013). При верификации кариотипа определяли число хромосом и их количественные и структурные аномалии (синдром Кляйнфельтера и его варианты - 47,XXY; 46,XY/47,XXY мозаицизм).

Молекулярно-генетическое исследование.

Анализ мутаций гена *CFTR* у пациентов с азооспермией выполняли с помощью метода ПДАФ (полиморфизма длин амплифицированных фрагментов) и MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification), исследование ТТ (IVS-8Т) полиморфизма - гнездовой ПЦР. Поиск микроделеций Y-хромосомы осуществляли в регионах *AZFa* (*SY84, SY86, SY254, SY255 и SY615, SY1316*), *AZFb* (*SY127, SY134, SY1264, SY1237, SY1235, SY121, SY124, SY1302*); *AZFc* (*SY152, SY157, SY158, SY242, SY254, SY255, SY1192, SY1197, SY1206, SY1054, SY1125, SY1291*) на программируемом термоциклере MC2 ("ДНК-технология", Россия) с использованием наборов для Y-специфичных локусов и ДНК-полимераз *Termus aquaticus* («Ферминтас», Литва) и *Biotaq* («БиоМастер», Россия). Тест-система разработана в лаборатории ДНК-диагностики под руководством д.б.н., проф. А.В. Полякова, ФГБНУ «Медико-генетический научный центр».

Подготовка биопсийного материала. Морфологическое исследование материала, полученного при биопсии яичка.

Сперматозоиды (зрелые сперматиды), извлеченные из семенных канальцев, использовали для оплодотворения ооцитов в программе ЭКО-ИКСИ, частично материал семенных канальцев отправляли для гистологического, электронно-микроскопического и иммуноцитохимического исследований синаптонемных комплексов (СинК) сперматоцитов I порядка.

После фиксации образцов семенных канальцев в 10% растворе формалина с последующей стандартной проводкой материала и подготовкой гистологических препаратов просматривали до 100 поперечных срезов, проводили морфометрию, используя систему ImageScore M с фотосъемкой микропрепаратов видеокамерой (Leica DFC 490). Сперматогенез оценивали в каждом сохраненном срезе тестикулярного канальца.

Для электронно-микроскопического исследования сперматозоидов биопсийный материал фиксировали в 2,5% р-ре глутарового альдегида, приготовленным на 0,1М какодилатном буфере (рН 7,2), при 4⁰С в течение минимум 24 часов. Дегидратацию материала производили в градиенте этилового спирта (50% - 30 мин., насыщенный раствор уранилацетата в 70% этаноле – 12 час, 96% - два часа), и ацетона (1 час). Материал (размер кусочков ткани не превышал 2x2 мм) заливали в эпон с предварительной пропиткой в смесях эпон-ацетон с повышающейся долей эпона (в соотношении 1:3 – 1 час, в соотношении 1:1 - 1 час, в соотношении 3:1 – 12 час). Полимеризацию проводили 24 час. при температуре 37⁰С и 24 час. при температуре 56⁰С. Полутонкие срезы биопсийного материала толщиной 1 мкм получали на ультрамикротоме Ultracut III (Reichert Jung) с помощью стеклянного ножа. Срезы помещали в каплю воды на предметных стеклах и высушивали над пламенем горелки. Срезы в течение 5–10 мин окрашивали 1% водным раствором метиленового синего, промывали в проточной воде и изучали в светооптическом микроскопе для выбора зоны семенных канальцев. После топографического сопоставления выбранной зоны и участка на поверхности

эпонового блока производили заточку пирамидки на микротоме Ultracut III с использованием алмазного ножа (Diatome AG, Switzerland) для получения ультратонких срезов толщиной 60-100 нм, которые затем контрастировали цитратом свинца (Reynolds, 1963) и исследовали в трансмиссионном электронном микроскопе JEOL1400 (Япония).

Метод количественного ЭМИС позволяет изучить морфологическую состоятельность сперматозоидов. Полученный после 2-5 дней полового воздержания эякулят разжижали на шейкере Thermo Scientific (США) при комнатной температуре 30 мин, помещали в центрифужную пробирку и разбавляли в 15 раз физиологическим раствором. Далее его аккуратно перемешивали, избегая образования пены, добавляли 0,1 – 0,2 мл фиксатора (2,5% р-р глутарового альдегида на 0,1М какодилатном буфере, pH 7,2) и центрифугировали 15 мин при 1000 об/мин в центрифуге ScanFuge Midi (Origio Scalab Equipment, Дания). Супернатант удаляли, а к осадку добавляли 1,0 – 1,5 мл фиксатора. Материал фиксировали сутки при $t=4^{\circ}\text{C}$. Дальнейшую обработку взвеси сперматозоидов и биопсийного материала семенных канальцев проводили по вышеописанной методике.

База исследований: НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова (д.б.н. Е.Е.Брагина).

При гистологической оценке ткани яичка использовали две классификации. Классификация по McLachlan R. et al. (2007)[218]:

1. Нормальный тестикулярный биоптат (Normal testicular biopsy) (при условии наличия полного сперматогенеза во всех биопсийных образцах и нормальной ткани семенных канальцев).
2. Гипосперматогенез (Hypospermatogenesis): все этапы сперматогенеза выражены, в той или иной степени. Сюда относятся и случаи присутствия только клеток Сертоли в отдельных канальцах. Наличие всех этапов сперматогенеза до стадии сперматид второго порядка (Sd2) указывает на способность яичек вырабатывать сперматозоиды.

3. Остановка развития герминогенных клеток (Germ cell arrest) является редкостью и регистрируется, как правило, на стадии сперматогониев или первичных сперматоцитов. Если небольшое количество сперматид визуализируется в одном из семенных канальцев, а остальные содержат только сперматоциты, ситуация классифицируется как выраженный (тяжелый) гипосперматогенез.
4. Сертоли-клеточный синдром (Sertoli cell-only appearance (syndrome)) констатируют только в отсутствие канальцев, содержащих половые клетки.
5. Гиалинизация семенных канальцев (Seminiferous tubule hyalinization) – диагностируется при наличии канальцев без половых клеток и клеток Сертоли. Это состояние сопровождается перитубулярным фиброзом и накоплением вещества базальной мембраны в перитубулярном пространстве.
6. Термин «Карцинома in situ» (Carcinoma in situ) используется для описания наличия преинвазивных злокачественных клеток в месте типичного нахождения сперматогониев или в канальцах с протекающим сперматогенезом.
7. Незрелые яички (Immature testis (prepubertal)) - редкая картина у взрослых мужчин с бесплодием, но типичная для гипогонадотропного гипогонадизма. Эпителий семенных канальцев содержит незрелые клетки Сертоли и половые клетки (обычно гоноциты или сперматогонии), в канальцах отсутствует просвет, между ними нет или очень мало клеток Лейдига.

Вторая классификационная шкала – балльная по Johnsen S.G. представлена в Таблице 1.3.

Таблица 1.3 — Исследования биоптата яичка по десятибалльной шкале Johnsen S.G. (1970г.) в модификации (2014г.)[421].

Стадия	Описание тестикулярных фенотипов	Баллы
Интактный (полностью сохраненный) сперматогенез	Много поздних сперматид и спермиогенных зон	10
Незначительная редукция сперматогенеза	Много поздних сперматид. Спермиогенез отмечается в единичных зонах	9
Заметная редукция сперматогенеза	Мало поздних сперматид. Спермиогенеза нет	8
Значительная редукция сперматогенеза	Много незрелых сперматид. Поздних зрелых сперматид нет	7
Сильная редукция сперматогенеза	Единичные ранние незрелые сперматиды	6
Арест на сперматоцитах II типа	Большое количество сперматоцитов I типа у просвета канальцев	5
Арест на сперматоцитах I типа	Малое количество ранних сперматоцитов (I типа)	4
Остановка сперматогенеза на сперматогониях	Все типы сперматогоний.	3
Только клетки Сертоли (SCO)	Клеток сперматогенеза нет	2
Никаких элементов сперматогенеза	Извитые семенные канальцы замещены соединительной тканью и основным веществом. Тени канальцев.	1

Иммуноцитохимическое исследование СинК профазных хромосом сперматоцитов I порядка.

Получение сперматоцитов человека. Использован биопсийный материал от мужчин после процедуры микродиссекции ТЕСЕ в программах ЭКО-ИКСИ: после извлечения зрелых сперматид для оплодотворения ооцитов часть семенных канальцев подвергали криоконсервации, из другой - экстрагировали сперматоциты I порядка.

Получение тотальных препаратов СинК из биоптатов ткани семенников проводили по методу Navarro J. et al. (1981) с модификациями Kolomiets O. et al. (2010).

Получение суспензии сперматоцитов. Кусочек ткани семенных канальцев переносили на стекло с лункой в которую предварительно наливали 0,5 мл среды Игла без глутамин (ПанЭко). Канальцы измельчали с помощью тонких пинцетов. Полученную суспензию переносили автоматической пипеткой в центрифужную пробирку и гомогенизировали. Степень

гомогенизации и клеточный состав суспензии оценивали под фазово-контрастным микроскопом, пробирку с суспензией помещали на лед.

Получение тотальных препаратов, распластанных СинК. На поверхность тефлоновой пластины наносили 6 капель (по 5 мкл) 0.2М раствора сахарозы. Поверх этих капель автоматической микропипеткой наслаивали по одной капле (2 мкл) суспензии сперматоцитов. Через 2 минуты поверхности капель касались предметным стеклом, покрытым поли-L-лизинном, который обеспечивает адгезию клеточных структур. Капли равномерно распределяли наконечником пипетки по первой трети поверхности стекла. Полученные препараты переносили на предварительно охлажденную в морозильнике пластину и подсушивали с помощью холодного фена. Препараты фиксировали в течение 7 минут охлаждённым 4% раствором параформальдегида приготовленном на 0.1М растворе сахарозы. (рН параформальдегида доводили до 8,2 с помощью боратного буфера). Далее препараты промывали в четырёх сменах 0,4% раствора Photoflo (Kodak) (по 10 сек в каждой смене) и сушили в вертикальном положении на воздухе в течение 30 мин. Готовые препараты хранили в морозильнике при -20°C . Для иммунофлуоресцентного мечения белков использовали методы, предложенные Moens et al., 1987 и Kolomiets et al., 2010. Антитела разводили в буфере DBS (*dilution bufer solution*), который используют для снижения неспецифического связывания антител с антигенами, готовили его, растворяя в буфере PBS (рН 7.3-7.5) бычий сывороточный альбумин (БСА) (3%) и Тритон-Х-100. Для подавления бактериальной флоры в буфер DBS добавляли 0,05% азид натрия (NaN_3).

Иммуноокрашивание препаратов антителами. Инкубацию с первичными антителами проводили на водяной бане при $t=37^{\circ}\text{C}$ в течение 1 часа, далее отмывали препараты в буфере PBS и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромами при $t=37^{\circ}\text{C}$ на водяной бане в течение 1-2 часов. Отмывали в 3-х сменах PBS - по 5 мин в каждой. Заключали препараты в среду Vectashield (поддерживает свечение флуорохромов) с красителем DAPI, специфически окрашивающим ДНК.

Перечень ядерных структур, выявляемых при иммуноокрашивании с помощью первичных антител, представлен в Таблицах 1.4, 1.5.

Таблица 1.4 — Первичные антитела и ядерные структуры, выявляемые с их использованием

Первичные антитела	Идентифицируемые клеточные структуры
Поликлональные кроличьи антитела против белка SCP3 - мажорного белка осевых элементов хромосом и латеральных элементов СК	Осевые элементы хромосом и СК
ACA - поликлональные аутоантитела человека к белкам кинетохора. Получены от пациентов с CREST синдромом	Центромеры
Поликлональные кроличьи антитела против белка репарации двуцепочечных разрывов ДНК Rad 51 (RECA- подобного белка)	Ранние рекомбинационные узелки (РУ)
Моноклональные мышинные антитела против белка мисматч репарации - MLH 1	Поздние рекомбинационные узелки (ПУ)
Моноклональные мышинные антитела против фосфолированного гистона γH2AX	Участки сайленсинга транскрипции хроматина
Моноклональные мышинные антитела к РНК-полимеразе II типа (POLOII)	Участки транскрипционно активного хроматина

Таблица 1.5 — Список первичных и вторичных антител, использованных в работе

Первичные антитела	Разведение	Вторичные антитела	Разведение
Кроличьи антитела против белка латеральных элементов синаптонемного комплекса SCP3 (<i>Abcam</i>)	1:100	Козьи антитела к IgG кролика, конъюгированные с FITS (<i>Jackson, USA</i>) или	1:800
		Куриные антитела к IgG кролика, конъюгированные с Alexa Fluor 594 (<i>Invitrogen</i>)	1:800
Антитела человека против белков кинетохора АСА (<i>Antibody Incorporated</i>)	1:100	Козьи Антитела к IgG человека, конъюгированные с AlexaFluor 546. (<i>Invitrogen</i>)	1:1000
Мышиные антитела к фосфорилированному гистону γ H2AX (<i>Abcam</i>)	1:100	Лошадиные IgG против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с FITC (<i>Jackson, USA</i>).	1:500
Мышиные поликлональные антитела к белку репарации двунитевых разрывов (ранние узелки рекомбинации) – RAD51 (<i>Abcam</i>)	1:100	Лошадиные IgG против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с FITC (<i>Jackson, USA</i>).	1:500
Мышиные моноклональные антитела к белку репарации двунитевых разрывов (поздние узелки рекомбинации) – MLH1 (<i>Abcam</i>)	1:200	Лошадиные IgG против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с FITC (<i>Jackson, USA</i>).	1:500
Мышиные моноклональные антитела к CTD повтору YSPTSPS (фосфо- S5) РНК-полимеразы II (<i>Abcam</i>)	1:1000	Козьи IgG против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 546 (<i>Invitrogen</i>). или	1:800
		Козьи антитела к IgG кролика, конъюгированные с FITS (<i>Jackson, USA</i>)	1:800

Препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axioimager D1 (Carl Zeiss, Германия) с наборами фильтров для DAPI (Zeiss Filter set 1) FITC (Zeiss Filter set 38HE) и Texas Red (Zeiss Filter set 43HE) микроскоп был оснащен камерой Axioscam HRm (программное обеспечение Axiovision rel. 4.6, Германия).

Исследование выполнено в лаборатории цитогенетики ФГБУН института общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН (зав. лабораторией – д.б.н. О.Л.Коломиец).

Обследование женщин из бесплодных пар с мужским/сочетанным фактором при проведении программ ВРТ включало: сбор анамнеза и жалоб, особенностей семейного и гинекологического анамнеза. Рассчитывали ИМТ по Brey (1978), оценивали тип телосложения и степень оволосения по шкале

Ferriman и Galvey (1961), развитие молочных желез по шкале Tanner (1962), наличие галактореи, экстрагенитальных заболеваний.

Проводили гормональное, микробиологическое исследования и оценку кариотипа; инструментальные – эхографию органов малого таза, гистероскопию с морфологическим исследованием соскобов и биоптатов, гистеросальпингографию, лапароскопию.

Заболеваемость женщин из пар с мужским фактором бесплодия отражена в Таблице 1.6.

Таблица 1.6 — Особенности репродуктивного здоровья женщин в парах с мужским/сочетанным бесплодием

Группы		N	Трубно-перитонеальное бесплодие	Сочетанное бесплодие	Синдром поликистозных яичников	Наружный генитальный эндометриоз,	Здоровые женщины
Азооспермия смешанная	абс.	76	10	15	11	17	23
	%		13,2	19,7	14,5	22,4	30,3
Азооспермия необструктивная	абс.	105	12	18	16	19	40
	%		11,4	17,1	15,2	18,1	38,1
Азооспермия обструктивная	абс.	79	27*’**	13	6	7	26
	%		34,2	16,5	7,6	8,9	32,9
			* 0,003 ** <0,001				

Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, ** - с НОА

Показатель бесплодия сочетанного типа составил 26,6% на всю выборку, частота синдрома поликистозных яичников (СПКЯ) в группе с ОА оказалась вдвое меньше, чем в остальных группах (14,8% против 7,6%), как и наружного генитального эндометриоза (НГЭ) (20,2% против 8,9%), однако статистически значимых отличий выявлено не было. Трубно-перитонеальный фактор в выборке пар с ОА встречался втрое чаще, чем в остальных группах ($p < 0,001$ – для смешанной азооспермии и $p = 0,003$ – НОА).

Этапы программы экстракорпорального оплодотворения:

- обследование и отбор пациентов (мужчин и женщин);
- стимуляция суперовуляции;
- мониторинг роста и развития фолликулов, состояния эндометрия (ультразвуковой и гормональный);
- назначение триггера овуляции;
- трансвагинальная пункция фолликулов и аспирация преовуляторных ооцитов под внутривенной анестезией;
- получение спермы (извлечение сперматозоидов), обработка, подготовка к оплодотворению;
- инсеминация классическим способом или методом ИКСИ ооцитов и культивирование гамет и эмбрионов до 3-5 суток развития;
- перенос эмбрионов в полость матки матери;
- поддержка лютеиновой фазы в посттрансферном периоде;
- диагностика беременности, ее ведение и родоразрешение.

Стимуляцию (индукцию) суперовуляции в лечебном цикле программы ЭКО применяли для роста и развития множества антральных фолликулов с целью получения нескольких преовуляторных ооцитов. В коротком протоколе (начало стимуляции со 2-3 дня менструального цикла) назначали агонисты (Диферелин 0,1мг, IPSEN, Франция) или антагонисты гонадотропин-рилизинг гормона (α -ГнРГ) и (анта-ГнРГ) (Цетротид 0,25 мг, MERCK, Швейцария) с целью десенситизации гипофиза и предотвращения пика собственного ЛГ, запускающего спонтанную овуляцию, рекомбинантные препараты ФСГ (α -фоллитропины - Гонал-Ф, MERCK, Швейцария; Фоллитроп, Эл Джи Лайф Саенсис ЛТД, Корея; β -Фоллитропины - Пурегон, MSD, США). Режим и дозы их введения зависели от общего состояния пациентки, количества и скорости роста фолликулов в яичниках. В длинном протоколе стимуляции овуляции с 21 дня предыдущего менструального цикла (МЦ) назначали агонист ГнРГ в депо-форме, либо ежедневно (Диферелин 3,75 мг/0,1 мг, IPSEN Франция).

Ультразвуковой мониторинг осуществляли на 2, 6, 9-10, 11-13 дни МЦ, регистрируя количество и размеры антральных фолликулов, ответивших на стимуляцию, толщину и структуру эндометрия. При достижении лидирующей группой фолликулов размеров 17-18 мм назначали триггер овуляции — хорионический гонадотропин человека (ХГч) (Прегнил 10000ЕД, MSD, США) или рекомбинантный ХГ (р-ХГ) (Овитрель 0,25 мг (6500ЕД), MERCK, Швейцария) однократно, что приводило к завершению второй фазы мейоза (переходу ооцитов из стадии метафазы I (МI) в метафазу II (МII)). Мониторинг уровней эстрадиола (E_2) и прогестерона в сыворотке крови дополнял УЗИ-контроль функциональной зрелости фолликулов.

Трансвагинальную пункцию преовуляторных фолликулов и аспирацию фолликулярной жидкости выполняли под контролем ультразвукового исследования (УЗИ). Пункцию проводили через 35-36 ч после введения триггера овуляции иглой 17G длиной 35 см (COOK, Австралия), присоединенной к аппаратной вакуумной системе Craft suction unit (Rocketmedical, Великобритания). Фолликулы пунктировали в один день до операции по экстракции сперматозоидов у мужчины. Фолликулярную жидкость просматривали в чашках Петри 60x15 мм под стереомикроскопом Olympus SZX10 (Япония) на теплой нагревательной поверхности в боксе IVF-Tech (Дания) при ламинарном потоке воздуха на предмет наличия ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК). При обнаружении ОКК их переносили в чашки 35x15 мм (NUNC, Дания) с теплой культуральной средой 37°C на основе буфера HEPES Gamete Buffer (COOK, Австралия) для отмывки от форменных элементов крови. ОКК перемещали в заранее подготовленные загазованные в атмосфере с содержанием CO_2 - 6% и O_2 - 5% 4-х луночные покрытые парафиновым маслом (ORIGIO, Дания) чашки NUNC с усовершенствованной средой Квина для оплодотворения (SAGE, Дания). Чашки с ОКК помещали в трехгазовый инкубатор Galaxy 170R с 6% содержанием CO_2 и 5% - O_2 , (остальной объем газовой смеси занимал азот (N_2)) при $t=37^\circ C$ для дальнейшего культивирования.

Получение сперматозоидов и подготовка ооцитов к инсеминации *in vitro*.

Биопсию яичек проводили с целью получения сперматозоидов для оплодотворения ооцитов в программе ЭКО-ИКСИ и уточнения генеза азооспермии. При ОА в день пункции фолликулов и аспирации ооцитов у женщин (жены/партнерши) с целью поиска пригодных для оплодотворения сперматозоидов выполняли их экстракцию: мультифокальную чрезкожную из ткани яичек (ТЕСЕ, TESE - Testicular Sperm Extraction), либо из содержимого канальцев придатков тестикул (ПЕСА, PESA - Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration) по общепринятым методикам.

При НОА практиковали открытую биопсию с технологией микрохирургического извлечения тестикулярных сперматозоидов (микро-ТЕСЕ). Для выявления расширенных участков извитых семенных канальцев яичка с предположительно сохранными, нередко единичными зонами сперматогенеза использовали операционный микроскоп фирмы Karl Kaps (Германия) с 30-кратным увеличением, с последующей микродиссекцией канальцев. Одновременно с микро-ТЕСЕ для вероятного получения эпидидимальных сперматозоидов применяли метод открытой микрохирургической аспирации из придатка яичка МЕСА (MESA - Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration).

Техника микродиссекции ТЕСЕ позволяет удалять меньшее количество тестикулярной ткани за счет оптической визуализации более крупных беловатых канальцев с сохранным сперматогенезом среди тонких и прозрачных. Это крайне важно при гипоплазии яичек, так как минимизирует повреждение интратестикулярных сосудов. Операцию проводили под спинальной анестезией: в субарахноидальное пространство вводили Sol. Marcaini-spinal 20 мг; с целью стабилизации гемодинамики внутривенно - Sol. Atropini 1,0 мг, Propofol 600мг. После обработки операционного поля в бессосудистой зоне мошонки (область *raphe scrotum*) производили разрез кожи и оболочек длиной около 3,0 см, тупым и острым путем освобождали и

выводили в рану яичко. Под операционным микроскопом при 10-кратном увеличении выполняли широкое рассечение белочной оболочки до 2,0–2,5 см вблизи срединной части яичка с минимальным нарушением кровоснабжения. Паренхиму яичка разворачивали на две части в поперечном срезе. При 30-кратном увеличении операционного микроскопа последовательно просматривали поверхность семенных канальцев. При гомогенной поверхности без структуризации отдельных расширенных канальцев проводили картирование – забор участков с частотой 3-4 диссекции на 1см^2 . При кровоточивости из подоболочечных сосудов выполняли коагуляционный гемостаз. При визуализации расширенных участков семенных канальцев с поверхности (максимально атравматично в бессосудистой зоне) и из глубины яичка осуществляли их диссекцию, с изучением паренхимы под операционным микроскопом при $\times 20$ -30-кратном увеличении, идентификацией отдельных непрозрачных белесых и более крупных по диаметру зон. Извлекали от 30 до 100 фрагментов ткани одного яичка объемом приблизительно $1,0$ - $1,5\text{ мм}^2$ и весом до 5-10 мкг. В отсутствие сперматозоидов в первом образце выполняли дальнейший забор из ипсилатерального, а затем и контрлатерального яичек или прекращали поиски во избежание риска трофических нарушений и повреждения структуры тестикулярной ткани. Полученные фрагменты семенных канальцев передавали в эмбриологическую лабораторию для поиска сперматозоидов. Последовательно накладывали швы на белочную оболочку, яичко погружали в соответствующую половину мошонки вместе с микродренажом, который удаляли на следующие сутки, производили ушивание оболочек (Рисунок 1.3).

Проводили оценку частоты извлечения сперматозоидов (ЧИС, SRR).

Все манипуляции в рамках протокола ЭКО и операции извлечения сперматозоидов осуществляли в отделении ВРТ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» МЗ России (зав. отделением И.И.Витязева).

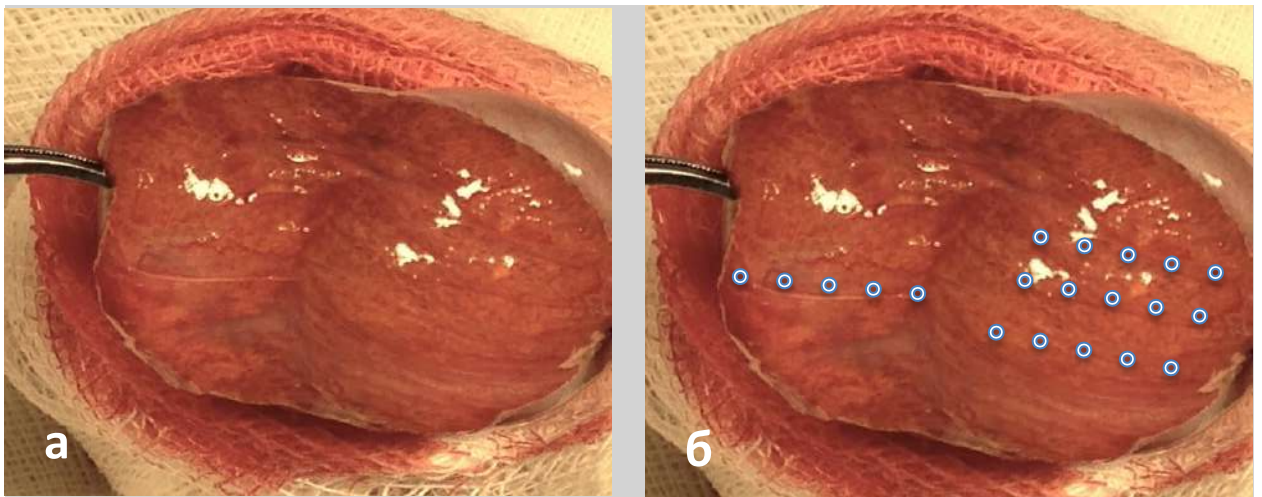


Рисунок 1.3 — а) Яичко на разрезе во время операции микро-ТЕСЕ. Визуализируются однородные семенные каналцы без видимых расширений; б) Принцип картирования (забора участков семенных каналцев с поверхности ткани яичка).

Эмбриологический этап подготовки извлечения тестикулярных сперматозоидов после микро-ТЕСЕ.

На начало операции микро-ТЕСЕ 4-6 чашек Петри 35x15 мм (NUNC, США) заполняли 2,0 мл буфера для гамет Gamete Buffer (COOK, Австралия). Извлеченные фрагменты семенных каналцев передавали в эмбриологическую лабораторию, где их подвергали предварительной трехкратной промывке в свежем буфере для удаления клеток крови. Затем механически проводили их измельчение (шреддинг) на более мелкие фрагменты, либо помещали в клеточный нейлоновый фильтр Cell Strainer 70 μm (FALCON, США), погружали в чашку Петри 35x15 мм с тем же буфером и растирали дном стерильной круглодонной пробирки на 14 мл (Thermo Scientific NUNC, Дания).

Первичную визуальную оценку наличия сперматозоидов в суспензии выполняли под инвертированным микроскопом Olympus IX71 (Япония) при 400-кратном увеличении и рельефном контрасте. Суспензию клеток выливали в центрифужную пробирку на 11 мл (Thermo Scientific NUNC, Дания) с 5,0 мл среды для приготовления сперматозоидов (ORIGIO, Дания) и центрифугировали в течение 15 мин при 300g; супернатант удаляли, а к осадку добавляли 200,0 мкл среды Эмбриоген (ORIGIO, Дания). Аккуратно перемешивали и оставляли на 30-40 мин при температуре 24-26°C.

Оплодотворение методом ИКСИ тестикулярными и/или эпидидимальными сперматозоидами, полученными при оперативном извлечении при ТЕСЕ/ПЕСА/микро-ТЕСЕ/МЕСА.

Подготовка чашек для ИКСИ: В центр на дно чашки (IVF ICSI Dish, Thermo Scientific NUNC, Дания) наносили по одной линии 3-4 капли по 5,0 мкл буфера Gamete Buffer (COOK, Австралия). Справа от линии добавляли продолговатую каплю PVP (SAGE, Дания) объемом 7,0 мкл и справа от нее наносили 3 капли звездчатой конфигурации объемом по 7,0 мкл среды Эмбриоген (ORIGIO, Дания). Поверхность чашки покрывали 5,0 мл парафинового масла (ORIGIO, Дания). В центр каждой звездчатой капли со средой Эмбриоген добавляли по 1-2 мкл суспензии сперматозоидов.

Если при предварительном осмотре сперматозоиды отсутствовали или имелись в единичном количестве, полученную суспензию раскапывали в чашки Петри 60x15 мм (Thermo Scientific NUNC, Дания) по 50 мкл, растягивали по дну чашки и покрывали 8,0 мл культурального масла (ORIGIO, Дания).

Полный просмотр осадка измельченной ткани выполняли под инвертированным микроскопом Olympus IX71 (Япония) с 400 кратным увеличением и рельефным контрастом. При обнаружении сперматозоида его извлекали микроиглой для ИКСИ (ORIGIO, Дания) и помещали в каплю с PVP (SAGE, Дания) в чашке для ИКСИ (Thermo scientific NUNC, Дания) (Рисунок 1.4).

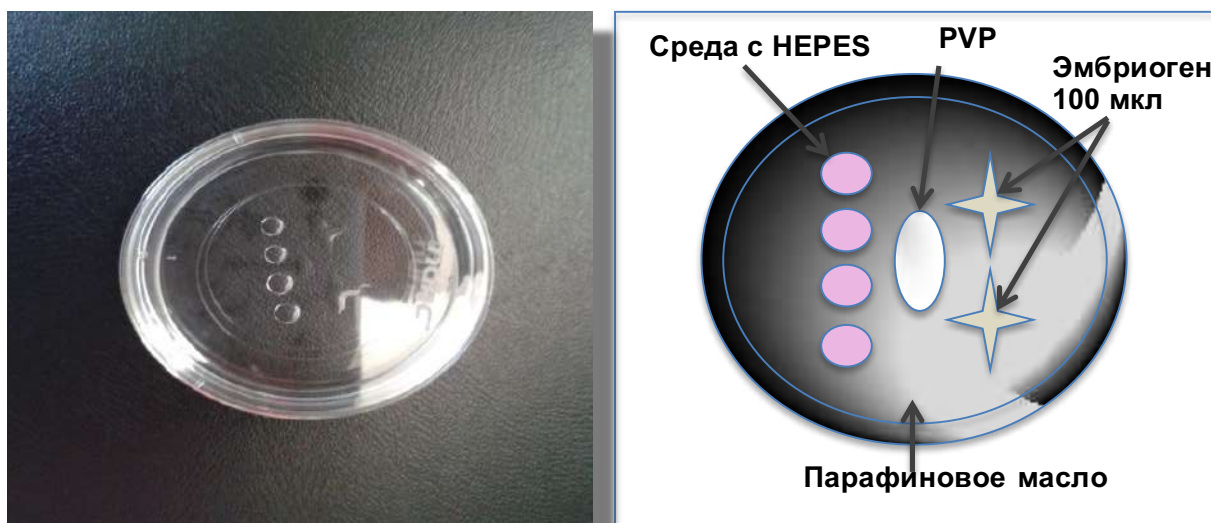


Рисунок 1.4— Подготовка чашек IVF ICSI Dish.

В капле с PVP сперматозоид промывали, обездвиживали путем надсечения жгутика в верхней трети и выполняли стандартную процедуру ИКСИ. После оплодотворения биологический материал замораживали по протоколу SAGE (Дания). В отсутствие сперматозоидов переходили к витрификации ооцитов для отсроченной реализации программы или использовали сперму анонимного донора из банка (по добровольному обоюдному согласию супругов). Через 3 часа после окончания пункции фолликулов в каждую лунку 4-х луночной чашки (NUNC, Дания) с ОКК добавляли по 150 мкл предварительно нагретой до $t=37^{\circ}\text{C}$ рекомбинантной гиалуронидазы человека - Кумулазы (ORIGIO, Дания). Чашки на 3 мин помещали в инкубатор, проводили механическую денудацию ооцитов капиллярами 150 и 175 мкм (MidAtlantic, США). Ооциты с минимальным или полным отсутствием клеток Corona radiata переносили в чистую лунку 4-х луночной чашки с усовершенствованной средой Квина с белком (SAGE, Дания). Чашку покрывали парафиновым маслом (ORIGIO, Дания) до момента ИКСИ.

Процедура ИКСИ:

Устанавливали иглы для ИКСИ (Origio, Дания) на микроманипуляторе Narishige (Япония). На инвертированном микроскопе Olympus IX71 (Япония) при 400 кратном увеличении проводили отбор подвижных сперматозоидов в звездчатых каплях со средой, содержащей гранулоцитарный макрофагальный колониестимулирующий фактор (Эмбриоген, Дания), и переносили их в каплю с PVP (SAGE, Дания). Ооциты, полученные во время пункции фолликулов и аспирации фолликулярной жидкости в день операции микро-ТЕСЕ, помещали в круглые капли с буфером для гамет Gamete Buffer (COOK, Австралия) в чашке для ИКСИ (IVF ICSI Dish, Thermo Scientific/Nunc, Дания).

Оценка качества эмбрионов.

При стандартной оценке качества осмотр эмбрионов проводили ежедневно однократно в сутки с регистрацией данных для отслеживания динамических изменений и отбора эмбриона лучшего качества для переноса в

полость матки матери и витрификации (криоконсервации). В протоколах с оплодотворением тестикулярными или эпидидимальными сперматозоидами, полученными во время оперативного извлечения, методом инсеминации избирали ИКСИ. На следующие сутки (первые) после ИКСИ эмбрионы осматривали для подтверждения факта оплодотворения (наличие двух пронуклеусов). Одно- и трех (четырёх)-пронуклеарные зиготы и ооциты без признаков оплодотворения элиминировали из процесса дальнейшего культивирования.

На 2 - 3 день развития качество эмбрионов определяли по количеству бластомеров, соответствующих дню развития, их равномерности, степени фрагментации - отношению мелких безъядерных частей цитоплазмы к нормальным клеткам (бластомерам), наличию патологических интрацитоплазматических включений (вакуолей). Чем выше доля фрагментации, тем ниже качество эмбрионов и хуже прогноз их дальнейшего развития. При нормальном развитии на 2 сутки после оплодотворения эмбрион состоит из 2-4 клеток (бластомеров), на 3-и - из 4-10, на 4 – от 10 – 16 до стадии компактизации (морулизации), к концу 4-х суток — до начала кавитации (образования первичной полости эмбриона).

По степени фрагментации эмбрионы классифицируют следующим образом: класс «а» - фрагментация отсутствует; качество эмбриона отличное; класс «в» - фрагментация до 25 % - качество хорошее; класс «с» - 25-50% фрагментации – качество удовлетворительное; класс «d» - фрагментация более 50 % - качество низкое.

Для эмбрионов 5 - 6 суток развития (бластоцист) оценку проводили уже по трем основным критериям, согласно классификации Gardner D.K. et al (1999)[199]:

- по размеру бластоцисты – степени ее расширения (экспандирования) в цифровом эквиваленте от одной (ранняя бластоциста) до 6 (полностью вылупившаяся бластоциста);
- по состоянию внутриклеточной массы (ВКМ) - первое буквенное обозначение от «А» (плотно упакованная, хорошо сформированная, без включений) до «С» (плохо

выраженная с дегенеративными изменениями);

- по состоянию трофобластической оболочки – второе буквенное обозначение от «А» (однослойная, многоклеточная с равномерным распределением) до «С» (дегенеративно измененные клетки).

Использовали неинвазивную технологию Time-lapse embryo monitoring report, позволяющую вести круглосуточное наблюдение и покадровую регистрацию морфокинетического развития эмбрионов внутри трехгазового инкубатора Galaxy 170S, с герметичным цифровым инвертированным микроскопом Primo Vision (Vitrolife, Швеция). Фрагментацию, ключевой морфологический параметр, отрицательно влияющий на имплантационный потенциал эмбриона, оценивали на 2-3-й дни развития.

Заморозка/разморозка ооцитов, эмбрионов и бластоцист

Витрификацию ооцитов, эмбрионов на стадии раннего дробления (2-3 сутки) и бластоцист (5-6 сутки развития) проводили, используя коммерческие наборы компании KITAZATO BioPharma Co., Ltd (Япония) для заморозки (Vitrification media) и разморозки (Thawing media)), согласно рекомендациям производителя, при комнатной температуре 23-25°C в 4-х луночных планшетах NUNC (Дания). Длительность нахождения в эквilibрационном растворе: 15 мин для ооцитов, 8 мин – эмбрионов на стадии раннего дробления и 12 мин – бластоцист. Заморозку ооцитов проводили после их денудации через один час после пункции фолликулов и аспирации ОКК. Пребывание эмбрионов в витрификационном растворе до переноса на открытый носитель для витрификации (KITAZATO BioPharma Co., Ltd, Япония) составляло не более одной минуты.

Разморозка витрифицированных ооцитов, эмбрионов и бластоцист проводилась согласно рекомендациям производителя в 4-х луночных планшетах NUNC (Дания). Под контролем стереомикроскопа открытый носитель с эмбрионами помещали в первый раствор при $t=37^{\circ}\text{C}$.

Перемещение эмбрионов по системе растворов проводили по стандартному протоколу ($t=23-25^{\circ}\text{C}$). Далее ооциты помещали в усовершенствованную среду Квина с белком для оплодотворения (SAGE,

Дания) на 1,5-2 часа до момента оплодотворения. Эмбрионы на ранних этапах дробления и бластоцисты переносили в усовершенствованную среду Квина с белком для дробления (SAGE, Дания) и аналогичную для бластоцист (SAGE, Дания) соответственно до момента переноса их в полость матки.

Положения, выносимые на защиту:

1. Полиэтиологичность типов азооспермии детерминирована суммой факторов, негативно влияющих на регуляцию сперматогенеза. Генетическое тестирование мужчин с азооспермией способствует определению причин бесплодия, прогнозированию реализации биологического отцовства в исходе ЭКО-ИКСИ и рисков передачи несбалансированного наследственного материала потомству.
2. Многоуровневость повреждений сперматогенеза требует комплексного обследования мужчин с азооспермией методами, позволяющими выявить рутинно не диагностируемые ультраструктурные и молекулярно-клеточные дефекты; необходимы патоморфологическое, иммуноцитогенетическое (оценка синаптонемных комплексов сперматоцитов I порядка) и электронно-микроскопическое исследования.
3. Дефекты мейотической конъюгации, рекомбинации и десинапсиса гомологичных хромосом в профазе I мейоза при оценке синаптонемных комплексов сперматоцитов I порядка могут служить причиной ненаступления беременности в протоколах ЭКО-ИКСИ или ее ранней потери при использовании экстрагированных из гонад сперматозоидов.
4. Реализация биологического отцовства при немозаичной форме синдрома Клайнфельтера достигается экстракцией с помощью микро-ТЕСЕ сперматозоидов, пригодных для оплодотворения в программах ЭКО-ИКСИ. Для минимизации риска хромосомных аномалий и анеуплоидий необходима преимплантационная генетическая диагностика эмбрионов.
5. Вероятность экстракции единичных зрелых половых клеток при азооспермии определяется очаговым характером повреждений гонад на ультраструктурном и молекулярном уровне при гетерогенности их структурно-

функциональных характеристик, объема и гистогенеза, что подтверждает многофакторность механизмов угнетения сперматогенеза.

6. Чрезмерная фрагментация ДНК сперматозоидов при избыточной массе тела и ожирении мужчин сопряжена с возрастанием ранних репродуктивных потерь.

7. Разработанные алгоритмы персонализированной диагностики и лечения инфертильных мужчин, предусматривающие патогенетически обоснованную коррекцию выявленных «повреждений» гонад и репродуктивных нарушений, способствуют наступлению беременности в парах после дифференцированного выбора вариантов современных инновационных технологий оплодотворения *in vitro*: в 50,6% при азооспермии (57,1% – ОА и НОА, 37,5% – смешанной азооспермией), 58,7% – избытке массы тела. Результативность использования сперматозоидов мужчин с азооспермией, экстрагированных из гонад/придатков методом микродиссекции или ТЕСЕ-ПЕСА доказывает наступление беременности у 47,6% пар (в «свежих» и криопротоколах – в 67,5% при ОА и 54,3% – НОА, криопротоколах и с размороженными сперматозоидами – в 20,8% при смешанной азооспермии); в сочетании с донорской спермой – в 100%.

Степень достоверности и апробация результатов.

Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием пакетов SPSS 22 (IBM, США) и STATISTICA (StatSoft Inc. США, версия 13.0), Microsoft Excel, различных – параметрических и непараметрических критериев в зависимости от типов выборок в блоках исследований.

Для оценки статистической значимости различий между сравниваемыми группами использовали параметрические критерии Стьюдента (t-критерий) наряду с однофакторным дисперсионным анализом, с целью множественных сравнений – вариант для сравнений по Стьюденту-Ньюману-Кейлсу; точный критерий Фишера (двусторонний); непараметрические переменные – Манна-Уитни (для двух групп), множественных сравнений – Краскала-Уоллиса. С

целью оценки наличия корреляции между переменными использовали методы Спирмена и Пирсона (коррелятивная связь – слабая ($r \leq 0,25$), умеренная ($r \geq 0,3-0,6$); сильная $r \geq 0,7$).

Статистически значимыми считались различия и коэффициенты корреляции при $p < 0,05$.

Материалы и основные положения диссертации доложены и обсуждены на: 8-м, 9-м Российских научно-образовательных Форумах «Мужское здоровье и долголетие» (Москва, 2010,2011); XX, XXII, XXVI Международных конференциях Российской Ассоциации Репродукции Человека (РАРЧ) «Репродуктивные технологии сегодня и завтра» (Нижний Новгород, 2010; Геленджик, 2012; Москва, 2016); I Всероссийском диабетологическом конгрессе (Москва, 2013); II Всероссийском конгрессе «Инновационные технологии в эндокринологии» с участием стран СНГ (Москва, 2014); Первом всероссийском научно-практическом проекте для врачей «Сахарный диабет 2 типа и ожирение – пандемия XXI века» (Новосибирск, Омск, Челябинск, Казань, Краснодар, Кисловодск, Санкт-Петербург, Москва 2015-2016гг); VIII международном конгрессе «Современные подходы к лечению бесплодия. ВРТ: настоящее и будущее» (Алма-Аты, Республика Казахстан, 2016); VII Всероссийском конгрессе Эндокринологов (Москва, 2016); I Всероссийской конференции «Репродуктивное здоровье женщин и мужчин» (Москва, 2016); VIII международной конференции по перинатальной медицине: новые технологии и междисциплинарные подходы (Екатеринбург, 2016); II Всероссийской конференции «Репродуктивное здоровье женщин и мужчин» (Москва, 2017); III Всероссийском эндокринологическом конгрессе с международным участием «Инновационные технологии в эндокринологии» (Москва, 2017). X и XI Общероссийском семинаре «Репродуктивный потенциал России: версии и контраверсии» (Сочи, 2017, 2018); III Всероссийской конференции «Репродуктивное здоровье женщин и мужчин» (Москва, 2018).

Автор самостоятельно осуществляла ведение бесплодных мужчин с азооспермией, патозооспермией и различным ИМТ – курацию до исходов

программ ЭКО-ИКСИ. Участие автора в сборе первичного материала — более 90%, обобщении, анализе и внедрении в практику результатов работы — 100%. Анализ статистических данных, формулировка выводов и положений, выносимых на защиту, выполнены самостоятельно.

По материалам диссертации опубликовано 22 научные работы в отечественной и зарубежной печати, из них 20 — в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Диссертация состоит из введения, которое включает в себя методологию и методы исследования, обзора литературы, шести глав, содержащих результаты собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, включающего выводы и практические рекомендации, указателя литературы, списка сокращений и условных обозначений. Работа изложена на 331 странице машинописного текста, иллюстрирована 71 таблицей и 108 рисунками. Указатель литературы содержит 469 источников, из них 35 – на русском и 434 – иностранных языках.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Современные представления об этиологии, патогенезе, диагностике, инновационных технологиях в лечении инфертильных мужчин с эндокринопатиями и тяжелыми нарушениями сперматогенеза

1.1 Этиопатогенетические и клинико-диагностические аспекты мужского бесплодия при азооспермии

Андрологические аспекты бесплодного брака в условиях сложившегося в Российской Федерации демографического провала обсуждаются с позиций нерешенной медико-социальной проблемы [28]. Диссонанс ведения МБ обусловлен отсутствием четких представлений об этиологии и патогенезе его отдельных форм, низкой эффективностью лечебно-диагностических подходов одновременно с констатацией потребности в расширении спектра лабораторно-инструментальных методов исследования состояния органов репродуктивной системы. Азооспермия, представляющая наиболее тяжелую форму патозооспермии за счет отсутствия сперматозоидов в эякуляте (при исследовании семенной жидкости после центрифугирования не менее чем 2 раза), выявляется в популяции у 1% мужского населения и 10-15% с бесплодием [123,141,173,346,421].

Различают обструктивную (ОА) - инкреторную, необструктивную (НОА) - секреторную формы азооспермии и их сочетание. Нарушение проходимости семявыносящих протоков при ОА может быть обусловлено травмой, урогенитальными инфекциями, операциями на органах мошонки, генетическими синдромами (муковисцидозом) [152,176,265,289]. НОА диагностируется при нарушении созревания или отсутствии сперматозоидов в ткани яичка у 10% бесплодных мужчин, тестикулярной недостаточности, причинами которой могут быть генетические нарушения (аномалии половых хромосом, транслокации и мутации в AZF-зоне Y-хромосомы), крипторхизм, воздействие репротоксикантов - радиоактивного облучения, химиотерапии и отравления токсинами [174,219,412]. Фактор обструкции семявыносящих протоков интра- и/или экстраэпидидимальной локализации,

отсутствие/снижение продукции или должного созревания сперматозоидов формируют сочетанную форму азооспермии.

Генетические факторы причисляют к распространенным причинам дисфункции органов мужской репродуктивной системы [54,104,176,253,304].

Изменение морфо–функциональных свойств сперматозоидов и их генома является следствием нарушений на любом из этапов сперматогенеза, обусловленных наследственными и экзогенными факторами [70,242].

Сперматогенез представляет собой сложный многоэтапный процесс, под контролем каскада генов, индуцирующих пролиферацию сперматогониев, инициацию и завершение делений мейоза, дифференцировку сперматид в сперматозоиды (спермиогенез) [444]. Уязвимость сложного и многоэтапного процесса образования половых клеток на фоне различных ХА и генетических мутаций заключается в выраженном угнетении и блоке сперматогенеза, дисморфогенезе гамет и их фертилизационных (оплодотворяющих) свойств [40,107,109,200,413].

Микроделеции Y-хромосомы (в субрегионах AZFa, AZFb и AZFc) занимают второе место в спектре всех генетических причин МБ (после нарушений кариотипа), встречаются в 10-15% случаев азооспермии и 5-10% олигозооспермии тяжелой степени, изолированно и сочетанно [32].

По кумулятивным данным [116], частота мутаций гена AZF у бесплодных мужчин составляет 3,5%. Варибельность показателей связывают с этнической неоднородностью выборок и методов исследований [116]. Наиболее часто микроделеции обнаруживают в субрегионе AZFc (до 72%) [116], реже – AZFb (15–16%) и AZFa (5–6%), комбинация – в 14–17% [32]. У большинства мужчин с микроделециями AZF-локуса верифицируется первичное бесплодие, в 80–85% – азооспермия [115,366].

Локус AZF содержит большое количество генов, избирательно регулирующих сперматогенную активность – от легкого снижения до полного отсутствия половых клеток в семенных каналах [283]. Выявление делеций субрегиона AZFa, «утрата» генов которого – *UTY*, *USP9Y* и *DBY* блокирует

созревание клеток сперматогенного ряда, значимо при обследовании бесплодных мужчин [76,408]. «Полную» делецию AZFb-субрегиона с отсутствием маркеров *sY127* и *sY134* связывают с отрицательным прогнозом для извлечения сперматозоидов при микро-ТЕСЕ [98]. Менее тяжелыми в отношении реализации репродуктивной функции являются делеции региона AZFc (75–80% от всех типов «полных» выпадений), одного из наиболее «динамичных» в геноме человека [20,176,404]. Влияние частичных AZFc-делеций (*gr/gr*, *b1/b3*, *b2/b3*, *b3/b4* и др.) и их подтипов на сперматогенез (от азоо- до нормозооспермии) и фертильность дискутируется – от снижения концентрации сперматозоидов и нарушений фертильности до отрицания подобной взаимосвязи [39,310].

По одним данным, *b2/b3* (*sY1191*) и *gr/gr* (*sY1291*) делеции встречаются у репродуктивно здоровых мужчин в китайской популяции; *b1/b2*, *b1/b3* и *sY1291*, *sY1197* варианты могут быть факторами риска дисфункции сперматогенеза [310]. В ряде исследований, включая мета-анализ более чем 12 000 мужчин, представлены доказательства ассоциации делеции *gr/gr* с нарушением сперматогенеза [48,207,308]: снижением количества и качества гамет [467]. Связь между делециями *gr/gr* и бесплодием варьирует в зависимости от этнического и географического региона, с наибольшей ассоциацией в европеоидных выборках [48].

Значимость делеций *b2/b3* как индуктора ухудшения сперматогенеза остается неуточненной [308]. Сообщается о снижении качества сперматозоидов, их связи с азоо- и олигозооспермией [207,308,467], особенно – в марокканской и ханьской популяциях [39,68,424]. Другие авторы указывают на отсутствие такой ассоциации [146].

Для делеции *b2/b4* субрегиона AZFc высокоспецифичны два маркера: *sY254* и *sY255* и утрата всех копий гена *DAZ* (*Deleted in Azoospermia*, гены, делетированные при азооспермии) [68,77].

Патогенетическая и клиническая значимость влияния частичных AZFc-делеций на клинические и/или гормональные особенности, сперматогенные

«фенотипы» и репродуктивную функцию остаются недостаточно изученными областями молекулярной андрологии [39,109,316].

Мутации в гене *CFTR* (около 250 из более чем 1800) связывают с нарушением сперматогенеза и/или оплодотворяющей способности гамет при азооспермии или олигозооспермии [33,55,105,143]. Частота отдельных полиморфизмов гена муковисцидоза при МБ составляет 12% (*delF508* и *5T(IVS8-5T)*), 5T-аллельного варианта – в полтора-два раза чаще популяционной встречаемости [34,219]. По другим данным [2], носительство мутантных полиморфизмов гена *CFTR* имеют 14,3% мужчин с НОА и 17,5% - олигоспермией.

Делеции в гене андрогенового рецептора *AR*, локализованного на длинном плече X хромосомы в локусе q11-12, кодирующем белок, транскрипционный фактор из 919 аминокислотных остатков, сопряжены с невозможностью попадания андрогенов в клетку. Обобщение мнений ряда исследователей представлено Черных В.Б. и соавт. [2], указавших на негативное влияние на сперматогенез «длинных» и «коротких» САG-повторов гена *AR* и его роль в снижении фертильности мужчин.

Понимание патофизиологии генетических заболеваний в сочетании с достижениями в области репродуктивной медицины способствовали изменению перспектив биологического отцовства у больных с азооспермией.

Распространенность синдрома Кляйнфельтера (СК) – наиболее тяжелой формы первичного мужского гипергонадотропного гипогонадизма в популяции варьирует (от 1/500 до 1/1000) и встречается в 10-12% при азооспермии [247,437,447].

Генотипы при СК: у большинства мужчин кариотип 47,XXY, – мозаицизм (46,XY/47,XXY) отмечен в 3 – 20%, с высокой частотой дисомных гамет (8,09 % против 0,11 % – в контроле) [2,247]. Сложности ранней коррекции андрогендефицитного состояния при СК – резкого снижения уровней ингибина В, Тест и инсулиноподобного фактора-3 (одна из его функций – инициация перемещения яичек в мошонку) на фоне гипергонадотропного состояния

предопределены запоздалой диагностикой заболевания – только в 25% до наступления половой зрелости [53,62,112,119]. Именно в период полового созревания апоптотическая гибель герминативных клеток и sustentоцитов отражается на уменьшении объема яичек (до 2-4 мл) с нарушением сперматогенеза до азоо-, иногда – криптозооспермии и угнетении их эндокринной функции [43,248]. Гетерогенность фенотипа мужчин с СК ввиду variability степени андрогенного дефицита реализуется в сопутствующих наличии дополнительной X-хромосомы эндокринных проявлениях: ожирении, гинекомастии, сахарном диабете, нарушении функции щитовидной железы, болях в спине и костях [16,17,119,453].

Варианты соматической дисморфологии, менее значительной при мозаичных фенотипах заболевания, объясняются генетическими стигмами дефицита андрогенов и чувствительности к ним рецепторов [247,293].

Представления об абсолютном бесплодии мужчин с мозаичной формой СК (47,XXY) сменились доказательствами наличия фокусов «незавершенного» сперматогенеза на фоне обширных полей клеток Лейдига и гиалинизированных семенных канальцев [13,170,287,437]. Причины разрушения зародышевых половых клеток (у большинства юношей до 14 лет) связывают с недостаточной инактивацией X-хромосомы, нарушением регуляции апоптоза клеток Сертоли и Лейдига [229,463].

1.2 Диагностика типов азооспермии

Исследования в области цитогенетики и молекулярной генетики позволяют утверждать о необходимости пересмотра тактики ведения мужчин с азооспермией – ввиду многофакторности ее патогенеза. Значительные перспективы открывают достижения в области геномной протеомики и транскриптомных технологий, позволяющие исследовать особенности генных и белковых взаимодействий при азооспермии [416].

Оптимальность диагностики на примере определения объема генетического тестирования в зависимости от типа азооспермии (показатели тестикулярной функции, объема яичек и гонадотропной функции гипофиза),

первичности или вторичности гонадной недостаточности способствует реализации адекватного лечебного подхода, необоснованная тактика (хирургическая и консервативная) может оказаться малоэффективной и финансово затратной. Определение наличия и типов AZF-микроделеций при азооспермии рассматривают в срезе оптимизации прогнозов экстракции сперматозоидов [32].

Гистологический анализ для дифференциации типов азооспермии оказывается решающим [160,218,421], однако существует потребность в унификации – единой морфометрической оценке биоптатов ткани. Подобные попытки предприняты McLachlan R.I. et al. (2007) [218] после модификации традиционной классификации по Johnsen S.G. (1970), однако трудности интерпретации данных требуют их сопоставления с результатами изучения ультраструктурных особенностей сперматозоидов мужчин с азооспермией.

1.2.1 Электронно-микроскопическое исследование сперматозоидов

Диапазон возможностей современных молекулярно-генетических методов диагностики раскрывает ЭМИС, наиболее приемлемое для оценки структур сперматозоидов – хроматина, центриоли, акросомы и постакросомного сегмента перинуклеарной теки [6]. Точность анализа состояния субклеточных структур нормальных сперматозоидов, значимость которых для реализации репродуктивной функции полагают неоспоримой, превосходит потенциал светооптической микроскопии [18]. Полноценность оплодотворения связывают с морфологической целостностью сперматозоидов – наличием конденсированного «зрелого» хроматина (ЗХ), прогрессивной подвижности и акросомальной реакции. Ядерное ремоделирование с превращением тонкогранулярного хроматина в компактный ЗХ осуществляется за счет замены гистоновых белков на протамины [158,204].

Преобладание «незрелого хроматина» (НХ) – гранулярно-фибрилярных нуклеопротаминовых комплексов диаметром около 40 нм (в норме – не более 28%, в среднем – 12%) полагают фактором риска спонтанных потерь беременности [5,169,225,460]. Нарушение компактизации хроматина связывают

с молекулярными поломками – диссоциацией межпротаминовых дисульфидных связей вследствие оксидативного стресса [299]. Сообщается о предикции безуспешных попыток ЭКО-ИКСИ при наличии аномалий ультраструктур сперматозоидов – акросомы, проксимальной центриоли, аксонемы жгутика, однако подобные исследования единичны [6]. Доказан высокий риск наследования в процессе ЭКО-ИКСИ множественных ультраструктурных особенностей сперматозоидов (частичное или полное отсутствие митохондрий, дисплазия фиброзного слоя, патология жгутика)[6]. Патологию головки сперматозоидов полагают причиной эмбриопатий и регресса беременности ввиду анеуплоидий, полиплоидий, мозаицизма.

Уточнение особенностей строения гамет – нарушения структур, обеспечивающих нормальную кинетику, пенетрационные свойства и функциональную компетентность сперматозоидов при оплодотворении позволяет установить причину бесплодия, определиться с лечебной стратегией – либо в пользу программ ВРТ, включая ПГД, либо, при риске наследования генетических аномалий – использования донорской спермы.

Дискутируется наличие корреляции между нарушением конденсации хроматина сперматозоидов и фрагментацией ДНК [400]. Большинство исследователей отрицают подобную взаимосвязь, отмечая сопоставимость рисков невынашивания при высоких показателях как НХ, так и разрывов ДНК [18,213]. Рассматривается возможность коррекции отдельных ультраструктурных повреждений с помощью противовирусной терапии при внутригаметном инфицировании ВПГ2, противовоспалительной и антиоксидантной – с целью устранения преждевременной акросомальной реакции сперматозоидов, сопутствующей микробной персистенции в эякуляте или лейкоспермии [6,8].

1.2.2 Исследование синаптонемных комплексов сперматоцитов I порядка мужчин с азооспермией

Неблагоприятное влияние причин развития НОА на возможность зачатия и вынашивания беременности обусловлено данными о высокой частоте дефектов хромосомного материала сперматозоидов при тяжелых формах патозооспермии [24].

Введение в практику количественного кариологического анализа состава незрелых половых клеток эякулята состоялось благодаря исследованиям проф. Л.Ф. Курило (1993) [20]. Работы О.Л. Коломиец и соавт. (2013) показали уникальность для реализации фертильности полноценности субмикроскопической структуры синаптонемного комплекса (СинК) – трехполосного остова между двумя гомологичными хромосомами [24]. Отсутствие или дефектность его компонентов связывают с блоками сперматогенеза – аномальным течением процессов мейотической конъюгации, рекомбинации и десинапсиса гомологичных хромосом, инактивацией участков хроматина, белков – когезинов, необходимых как опорной структуры и состоятельности процесса сближения сестринских хроматид [21,317]. Нарушение течения когезии, ответственной за правильное расхождение хромосом, негативно влияет на профазу мейоза I [11]. Отсутствие белков латеральных сегментов СинК Single-cell protein (SCP2 и SCP3, трансверсальных филаментов – белок SCP1 и центрального – SYCE1 и SYCE2) [415], которые кодируются аутосомными раково-тестикулярными генами, препятствует синапсису хромосом с развитием блока сперматогенеза на стадии зиготены и невозможности образования бивалента [149]. В отсутствие белка TEX15 утрата способности к репарации двунитевых разрывов ДНК в экспериментах на мышцах приводит к нарушению синапсиса хромосом, кроссинговера, клеточной гибели и, как следствие, к стерильности особи [138,149]. Аномальная активность гена *MLH1* (*MutL homologue 1*), ответственного за синтез белка – участника кроссинговера препятствует формированию хиазмального комплекса, тормозит процесс сперматогенеза на стадии пахитены – диплотены

[414]. Сообщается об индукции тяжелых форм патозооспермии блоками, определяющими невозможность полноценного формирования СинК и кроссинговера хромосом – в частности, на стадии зиготены-пахитены профазы I мейоза, однако единичность исследований препятствует формированию рекомендаций для дифференцированного ведения подобного контингента [415]. Исходом диссоциации эпигенетической регуляции экспрессии генов выступает риск ранних эмбриональных потерь [100,102]. Выявление мейотической катастрофы – ядер клеток не только с обломками хромосом, но и фрагментами СинК указывало на дегенерацию сперматоцитов на стадиях лептотены и зиготены. Феномен «кольцевых» СинК обусловлен потерей прителомерных фрагментов уже завершивших синапсис гомологов и, соответственно, связи хромосом с ядерной оболочкой и деформацией ядра. Множественную фрагментацию хромосом в митозе рассматривают как механизм селекции сперматоцитов I порядка, инструмент «выхолащивания» передачи хромосомных нарушений потомству [24,449]. Снижение рисков хромосомного дисбаланса эмбрионов достигается FISH-диагностикой анеуплоидий сперматозоидов, важной составляющей в программе предварительного генетического обследования бесплодных мужчин [35].

1.3 Влияние избыточной массы тела и ожирения на мужскую фертильность. Методы исследования фертильности при эндокринопатиях и тяжелых нарушениях сперматогенеза

Представления о влиянии ожирения мужчин на репродуктивную функцию сводятся к превалированию данных об ухудшении семиологических параметров при меньшем количестве отрицаний взаимосвязи для объема, подвижности или морфологии гамет [92,147,186,230,234,296,433]. Ряд мета-анализов указывает на сопряженность олигозооспермии и азооспермии с ИзбМТ и ожирением [91,92]. Сообщается, что возрастание доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК на фоне избытка массы тела мужчин приводит к нарушению компактизации хроматина в процессе спермиогенеза [176,238,245,382]. Полагают, что свойственное избытку жировой

массы хроническое воспаление и оксидативный стресс [296], индуцируя одно- и двучепочечные разрывы хроматина сперматозоидов и ослабление акросомальной реакции, способствуют снижению частоты оплодотворения (ЧО; fertility rate, FR), имплантации (ЧИ; Implantation rate, IR), наступления беременности (ЧНБ; pregnancy rate, PR) и вынашивания [12,18,46,91,230, 271,425,430].

Минимальный индекс фрагментации (ИФ) ДНК – до 1-5% дефектных сперматозоидов (по другим данным – менее 15%) обеспечивает механизм адекватной репарации разрывов, однако гарантом полноценности мужской фертильности его не считают [225]. Нарушение целостности ДНК более 30% рассматривают как причину МБ [382,437]. Молекулярно-биологическим предиктором повреждения гамет при избытке массы тела мужчин считают неадекватную замену белковых комплексов гистонов на протамины, дисбаланс их типов [101], эпигенетические изменения с развитием нарушений последовательности ДНК при метилировании [100].

Диагностическая значимость оценки целостности ДНК признается не всеми авторами: одни – порицают сам факт рутинного использования тестов при МБ, другие акцентируют внимание на большей точности методик TUNEL (*TdT-mediated dUTP Nick End Labeling*) и COMET (*Single cell gel electrophoresis*) [122,318,388]. Целесообразность включения в алгоритм диагностики причин МБ исследования на ИФ ДНК сперматозоидов объясняют высоким риском передачи аномального генетического материала при ИКСИ в отсутствие механизмов естественного отбора гамет.

Показано влияние нарушения геномной целостности сперматозоида на ряд параметров: дробление blastомеров, имплантацию, ЧНБ и деторождение [135,382]. Подтверждением выступают факты большей ЧНБ при ИФ менее 27% [393], коэффициента рождаемости после ЭКО-ИКСИ [260], роста выкидышей с увеличением доли сперматозоидов с высоким ИФ (37% – против 10% в отсутствие повреждений хроматина) [245], причем независимо от

используемых методов ВРТ и тестов оценки целостности ДНК сперматозоидов [224,390].

Показатели деторождения протоколов ЭКО-ИКСИ в парах с избытком массы тела мужчин (на 84% в сравнении с парами, ИМТ мужчин в которых соответствует «нормальному»), указывают на необходимость уточнения механизмов неблагоприятного влияния ожирения [275].

Результаты анализа 16 когортных исследований (2969 пары) показали возрастание частоты выкидышей при высоком ИФ мужчин при анализе методом TUNEL [430]. Неоднозначность выводов в отношении ассоциации степени ИФ и параметров спермы объясняют влиянием ряда факторов и гетерогенностью исследований.

Ограниченность диагностических подходов при обследовании бесплодных мужчин с тяжелыми формами патозооспермии может способствовать выбору необоснованной лечебной тактики: при отказе или невозможности медикаментозного лечения использованию собственных вместо донорских сперматозоидов при высоких показателях одно- и двунитевых разрывов ДНК [394].

1.3.1 Оценка функциональной зрелости сперматозоидов при первичном исследовании эякулята

Дополнением стандартному семиологическому анализу выступает метод оценки физиологической зрелости сперматозоидов НВА-тест (*Sperm-Hyaluronan Binding Assay* - на связывание спермиев с гиалуроновой кислотой, или гиалуронаном) [324]. Оценивается способность к преодолению экстрацеллюлярного матрикса ооцитарно-кумуляного комплекса (ОКК) - линейного полисахарида гиалуроната и достижения его в ампулярном отделе маточной трубы. Возможность пенетрации внеклеточного матрикса определяет наличие на плазмолемме гиперактивированных сперматозоидов поверхностной гиалуронидазы к гиалуронату - рецепторов SPAM1 (sperm adhesion molecule 1 (PH-20 hyaluronidase, zona pellucida binding)), которые появляются на терминальных этапах спермиогенеза [455]. SPAM1 –

одноцепочечный гликопротеин с гликозилфосфатидилинозитольной областью прикрепления белка к мембране сперматозоида. Нейтральный каталитический домен осуществляет гиалуронидазную активность в отношении кумулюсного матрикса, кислотный каталитический – после слияния акросомы с плазмолеммой спермия облегчает пенетрацию. Изменение конфигурации и достижение максимальной экспрессии молекул SPAM1 при проникновении через кумулюсный матрикс обеспечивает белок теплового шока HSP A2 (Heat Shock Protein A2) [244,334,426]. Данные о механизмах ассоциации сперматозоидов с гиалуронатом определяют интерес к введению НВА-теста как скрининга – до вступления пар в программы ЭКО-ИКСИ. Представляется целесообразным выделение предикторных значений спермограммы для реализации тестирования.

1.4 Методы обнаружения сперматозоидов при азооспермии

Варианты преодоления сперматогенных нарушений – «открытые» и пункционные методы тестикулярной экстракции гамет многообразны: чрескожная аспирация сперматозоидов из придатка яичка (ПЕСА) и из его ткани (ТЕСА) [137,220,222,436]. Применение с 1997 г. тонкоигольной биопсии (testicular fine needle aspiration – TFNA) вместо «открытой» (МЕСА) с целью получения сперматозоидов из придатка яичка для ИКСИ несколько уменьшило повреждение тканей [86]. Ряд исследований, один – мета-анализ с участием 1890 мужчин с НОА указали на микро-ТЕСЕ (микродиссекцию) как «золотой» стандарт ввиду большей ее эффективности в сравнении с традиционной ТЕСЕ [131,142,194,237]. По данным трех проспективных исследований, ТЕСЕ более эффективна, чем TFNA, однако основания для рекомендации одного из методов, согласно Кокрановскому обзору, отсутствуют [417], за исключением типов азооспермии и навыков хирурга [131,137]. Трудоемкость микро-ТЕСЕ и потребность в техническом обеспечении нередко выступают основанием для выбора традиционной ТЕСЕ [421]. Сопоставимость SRR отмечали после первичной безуспешной ТЕСЕ и вторичной микро-ТЕСЕ (45,7% против 44,0%)[413]. Преимущество микродиссекции – в минимизации повреждения

яичек и удаляемой ткани за счет многократного увеличения очагов сперматогенеза при помощи операционного микроскопа (в 50-70 раз) [175,178,360,457], при показателях SRR в 40-60% [99,320].

Эффективность микро-ТЕСЕ с позиций большей SRR подтверждают данные Ramasamy R. et al. [413], особенно при наличии Сертоли клеточного синдрома (СКС). По результатам А. Tsujimura et al. [450], при сопоставлении исходов ТЕСЕ и микро-ТЕСЕ (SRR - 35,1% и 42,9%) большей продолжительности микродиссекции (146,8 мин против 68,2 мин) соответствовало выявление сперматозоидов при гомогенном состоянии семенных канальцев и только у 65,4% из 26 пациентов с гетерогенными образцами.

Возможность реализации отцовства при СК появилась с внедрением в практику микрохирургической техники экстракции сперматозоидов из гонад с диапазоном эффективности манипуляций (SRR) – 28-69% (51% в среднем) [84,272,412,448]. Сообщается о сопоставимости показателей SRR с таковыми при НОА и нормальном кариотипе [53,141,251,448]. Различие SRR при СК связывают с позиций влияния возраста мужчин, в котором осуществляется экстракция сперматозоидов. Целесообразность извлечения сперматозоидов в подростковом возрасте с целью консервации до периода реализации фертильности дискутируется: сторонники указывают на прогрессирование с возрастом тестикулярной дегенерации, оппоненты – риск ятрогенного ее усугубления с повреждением тканей после пункций [47,72,248,249,332,351].

О большей эффективности микродиссекции при СКС сообщает Deruyver Y. et al. [142], несмотря на дефицит рандомизированных клинических исследований. Различия исходов микро-ТЕСЕ при гистологических вариантах при СКС (при СКС (33,9% против 6,3%)) и остановке сперматогенеза (ОС)(75% против 37,5 %) связывают с оптической неоднородностью и внешним однообразием семенных канальцев соответственно [134].

По отдельным данным [141], сообщается о меньшей вероятности осложнений, атрофии и рубцовых изменений после микродиссекции [413].

Осложнения хирургического извлечения сперматозоидов: повреждение яичек может быть обусловлено либо нарушением кровоснабжения семенных канальцев, либо повышением внутритестикулярного давления вследствие кровоизлияния под практически нерастяжимую белочную оболочку [450]. Отсутствие зон деваскуляризации после обоих методов биопсий подводило к приоритету микро-ТЕСЕ за счет большей SRR при НОА (47,0% против 30,0%)[155], как и меньшей частоты выявляемых по данным сонографии гонад осложнений [142,193,336,450].

Приведены данные о целесообразности послеоперационного обследования уровней Тест, ЛГ, ФСГ через 6-9 месяцев после микродиссекции [58] ввиду снижения концентрации сывороточного Тест, с восстановлением его уровня до 50% через 12 мес. после вмешательства [58,277,336,373]. Другие авторы наблюдали меньшее снижение гормона после ТЕСЕ – на 20% в течение 3-6 месяцев с восстановлением до 95% от исходного через 18 месяцев [133,336] или сохранность низких значений [378]. Падение уровня Тест связывают с исходно небольшим объемом яичек и потерей клеток Лейдига, формированием рубцовых зон в области операции [134,362]. Полагают, что реактивность на гормональную терапию мужчин с гипергонадотропным гипогонадизмом следует рассматривать как предиктор благоприятного исхода лечения бесплодия.

Исследования А. Oliveira et al. [277] на кроликах показали отсутствие изменений уровней ЛГ, ФСГ и тестостерона в течение 45 дней после микрохирургической биопсии яичка, как и морфометрических показателей семенных канальцев. Остановку развития терминального эпителия в контрлатеральном яичке авторы связывали с повреждением внутрияичковых сосудов, выраженной воспалительной реакцией и активацией антиспермального иммунитета, отмечая целесообразность тщательного ведения послеоперационного периода.

Проблемы использования при ИКСИ круглых сперматид в отсутствие зрелых половых клеток при НОА дискутируются ввиду недостаточной

доказательной базы безопасности и результативности [60,243]. По отдельным данным, SRR при микро-ТЕСЕ превосходит ТЕСЕ – 42,9-63% против 16,7-45% [142,457].

Мнения об эффективности повторных пункций гонад противоречивы: по одним данным, противопоказания к микро-ТЕСЕ после ранее отрицательных биопсий отсутствуют, другим – SRR у мужчин после трех–четырёх биопсий были значительно ниже, чем одной–двух (23% vs 51%) [155,357]. Данные о результативности первой, второй и третьей попыток ПЕСА варьируют – 91%, 89% и 86% соответственно [182]. Сообщается о большей эффективности повторных попыток экстракции сперматозоидов после ТЕСЕ и сведения к минимуму осложнений при соблюдении полугодового восстановительного периода.

1.4.1 Критерии успеха инвазивных манипуляций на яичках. Прогноз получения сперматозоидов до операции

Отрицательное психологическое влияние неуспешной тестикулярной экстракции сперматозоидов определило интерес к факторам, ассоциированным с вероятностью их выявления: возраст пациента при орхиопексии по поводу крипторхизма [141], перенесенный в анамнезе орхит, СК, суммарный объем яичек, гипогонадизм, микроделеции в AZF-зоне Y-хромосомы, АМГ и ингибин В, отсутствие сперматозоидов при диагностической биопсии яичек [450]. Большинство исследователей склоняется к мнению об отсутствии предикторов выявления тестикулярных/эпидидимальных сперматозоидов при НОА [331]. По отдельным утверждениям [239], наличие генетических аномалий, СК, микроделеций Y-хромосомы оказывает серьезное неблагоприятное влияние на уровни гонадотропинов, объем яичек и количество сперматозоидов.

Влияние высокого уровня ФСГ на SRR дискуссионно: одни авторы отрицают подобную взаимосвязь на примере возможности экстракции зрелых сперматид практически у половины представителей с НОА [216,221,421], другие – утверждают о негативном прогнозе [406].

Приведена отрицательная прогностическая ценность для успешной экстракции сперматозоидов тестикулярного объема, уровня тестостерона и ответа на терапию гонадотропинами [51].

Имеются указания на отсутствие связи объема яичек и уровня ФСГ с результативностью повторных микро-ТЕСЕ у мужчин с СК [413]. Исследование R. Ramasamy et al. [216] показало, что SRR у 792 мужчин с НОА и уровнем ФСГ 15-30, 31-45 и >45 МЕ/мл составляло 60%, 67% и 60% соответственно, что выше, чем с показателем менее 15 МЕ/мл (51%).

Согласно данным I. Ghalayini et al. [113], эффективность микро-ТЕСЕ (56,9% и 38,2% в сравнении с обычной ТЕСЕ) определяла положительная корреляция с объемом яичек и отрицательная – уровнем ФСГ. Отсутствие потребности в послеоперационной терапии гипогонадизма указывало на приоритет микродиссекции при гипотрофии яичек и высоком уровне ФСГ [113,133,189,420] и диссонировало с данными гистологических заключений – при наличии в анамнезе результатов предыдущей биопсии [183,420].

Мнение, что отсутствие сперматозоидов в биоптатах не отражает гистологическую картину во всем яичке, актуализирует вопрос состоятельности диагностической пункции в прогнозировании исходов ТЕСЕ [421]. Показана вариабельность SRR в зависимости от гистологических заключений: при микродиссекции яичек мужчин с СКС и сперматоге́нным «арестом» – 29% и 44% соответственно, НОА (31%) и СК (40%) – не отличалась от средних показателей в выборках [246].

Роль АМГ, представителя семейства трансформирующих факторов роста, продуцируемого в семенных канальцах клетками Сертоли, с позиций предиктора состоятельности тестикулярной функции, активно обсуждается [374]. По данным Т. Mostafa и соавт. [370], уровень АМГ положительно коррелировал с объемом яичка, количеством и подвижностью; отрицательно – морфологически аномальных сперматозоидов; в меньшей степени – с возрастом мужчин и уровнем ФСГ в сыворотке крови. Отрицание предиктивной значимости АМГ в семенной плазме мужчин с ОА для экстракции

сперматозоидов оказалось обусловлено «успешным» микро-ТЕСЕ в 57,5% и отрицательным ответом у 58,2% представителей с «неудачными» манипуляциями [370].

Роль уровня ингибина В, секретируемого клетками Сертоли и участвующего в регуляции секреции ФСГ, в качестве предиктора сперматозоидов остается неуточненной [98,240]. По данным одних авторов, его значимость как маркера отрицается [45], других – коррелирует с активностью сперматогенеза и SRR [101] наряду с ФСГ [32]. По утверждениям ряда исследователей [98], значение в 6,25 пг/мл выступает маркером успешности микро-ТЕСЕ (чувствительность 90%, при низкой специфичности и диагностической точности – 14% и 53,8%). Альтернативно мнение о низкой информативности уровней АМГ и ингибина В в семенной плазме для прогноза вероятности экстракции сперматозоидов при НОА [370,372,385], за исключением оценки подвижности сперматозоидов после криоконсервации [371]. Установлена положительная корреляция между концентрацией ингибина В в семенной плазме и количеством сперматозоидов, но не для АМГ [385]. По другим заключениям, о наличии сперматозоидов при НОА (59,6%) свидетельствовало сочетание двух параметров из трех (ФСГ, ингибина В и объема яичек), однако надежность их использования оспаривало превышение показателями пороговых значений [98]. По другим данным, уровень ингибина В не превосходит по прогностической значимости ФСГ, как и их комбинация не повышает диагностическую точность в прогнозировании исходов ТЕСА [125]. Небезынтересны данные о сопоставимой SRR после орхопексии – в обеих гонадах [383].

Представления о значимости объема яичек и уровня Тест в качестве маркеров сперматогенеза разделяют не все исследователи [421]. Ряд из них связывает с эффективностью ТЕСЕ более высокий уровень тестостерона [320]. По отдельным данным, несоответствие базового низкого уровня Тест в сыворотке крови степени активности сперматогенеза в семенниках опровергает возможность его использования как предиктора исходов микро-ТЕСЕ [141].

В исследовании Ramasami et al. [412], концентрация сывороточного Тест и соотношение Тест/эстрадиол после предоперационной медикаментозной терапии у мужчин с положительным результатом экстракции зрелых сперматид оказалась выше, чем с неуспешными попытками. Предикторным значением Тест для высокого шанса SRR (250 нг/дл) (77% против 55%) считали уровень более 8,7 нмоль/л.

Исследование влияния продолжительности микродиссекции на ее результативность на примере 793 операций у мужчин с НОА Ramasamy R. et al. [157] показало наибольшую вероятность SRR в течение первых двух часов операции (89%). Сперматозоиды были успешно получены у 57% мужчин: по группам – до двух ч., через 2-4 и 4-7 ч. – в 89%, 30% и 37% соответственно. Ретроспективный анализ данных не выявил конкретного времени, после которого извлечение сперматозоидов оказывалось невозможным. Среднее время операции составило 1,8 ч (0,5–6,6 ч), безуспешных манипуляций – 2,7 ч (0,8–7,5 ч).

Возраст для экстракции сперматозоидов как предиктор эффективности прогноза SRR наиболее значим у мужчин с СК [50,379]. Результативность других факторов – медикаментозной заместительной терапии с перипубертатного возраста, уровня Тест (низкого или нормального) и гонадотропинов активно обсуждается [129,247,351]. Прогностически неблагоприятными в отношении получения качественных сперматозоидов при СК считают принадлежность к старшей возрастной группе и отсутствие эффекта от гормонотерапии [77,412].

Ретроспективная оценка Gul U. et al. [402] факторов прогнозирования экстракции сперматозоидов у 134 мужчин с СКС при ТЕСЕ показала отсутствие их сопоставимости (возраст, продолжительность бесплодия, объем яичек, уровни ФСГ, ЛГ и Тест) при различных исходах экстракции сперматозоидов (27,6% и 72,4% соответственно).

А. Tsujimura и соавт. [450] в ретроспективном исследовании 100 мужчин с НОА с помощью многофакторного логистического моделирования

проанализировали 9 предоперационных факторов, включая возраст, объем яичек и эндокринные параметры. С учетом выявленной наибольшей информативности показателей ФСГ, Тест общ и ингибина В определена формула расчета вероятности успешного исхода микродиссекции: $P = [1 + \exp(5,201 - 0,048 \times \text{ФСГ} - 0,449 \times \text{Тест} - 0,021 \times \text{ингибин-В})]^{-1}$.

Чувствительность и специфичность результатов расчета составляли соответственно 71,0% и 71,4%.

До выявления новых перспективных молекулярно-генетических маркеров остаточного сперматогенеза при НОА наибольшей прогностической ценностью с позиций SRR обладает тип AZF-микроделеций [141]. Влияние генотипа на «фенотип» дискутируется: сопоставимые характеристики тканей яичек обнаруживают в присутствии различных типов микроделеций, неоднородные повреждения гонад – при идентичных мутациях гена. Неоднозначность выводов о взаимосвязи типа делеции с успешностью поиска сперматозоидов усложняет выбор патогенетически обоснованной лечебной тактики. Обобщение Н. Sadeghi-Nejad et al. результатов 78 публикаций по НОА показало вероятность извлечения сперматозоидов при микро-ТЕСА, отсутствие влияния на оплодотворение и наступление беременности при наследовании мутаций субрегиона AZFc [355]. Вектор корреляции между носительством делеций и недостаточностью сперматогенеза детализирует результаты исследований: их наличие более чем в одном субрегионе или при полных вариантах (AZFa, AZFb, AZFb+c) обуславливает практически во всех случаях синдром «только клетки Сертоли» (СКС) и невозможность получения сперматозоидов [132,159]. Описывается вариабельность гистологической картины при частичных AZFc-делециях – от минимального количества половых клеток в семенных канальцах, соответствующего СКС, до фокусов сперматогенеза [469].

По данным тайваньских ученых, наличие «частичных» AZFc-делеций соответствует недостаточности сперматогенеза [313]; блокаду продукции полноценных гамет связывают с делециями всего комплекса AZFa,b,c, сочетанием AZFb+c [32,268]. Вопреки дискутабельности мнений о

соответствии гистологических характеристик типам делеций в AZF-регионе, полагают необходимым предварительное генетическое тестирование с целью прогноза успешности биопсии яичек [338,469]. Обсуждается значимость повышенного уровня ФСГ как маркера при носительстве AZF микроделеций [340].

Мнение о необходимости скрининга пациентов с СК на микроделеции AZF региона противоречиво [201,354]. Hadjkasem-Loukil L. et al. [201] выявили, что изменения кариотипа не являлись прерогативой большей встречаемости генных мутаций локуса «фактора азооспермии»: при СК классические микроделеции имели место у 6 из 9 пациентов, как и частичная gr/gr-делеция, которую в отсутствие ХА определяли у 4 из 18 пациентов наряду с двумя b2/b3 и одной AZFc-делецией. Choe J.H. et al. считают, что классическая AZF-делеция у пациентов с кариотипом 47,XXY не является основополагающей в генетической предрасположенности к СК [354]. Другими авторами сделан вывод, что популяция мужчин с СК может включать носителей AZF микроделеций, скрининг на которые должен быть частью диагностики при планировании лечения их бесплодия методом ЭКО-ИКСИ [366]. Повышенный риск анеуплоидии половых хромосом и аутомсом потомства пациентов с СК требует проведения преимплантационной генетической диагностики (ПГД) [90,170,437].

1.4.2 Предоперационная гормональная терапия

Проблема выбора препаратов для коррекции андрогендефицитных состояний – ингибиторов ароматазы (ИА), хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) или кломифена цитрата обусловлена отсутствием контролируемых клинических испытаний [177,223,300,336].

Однако при различном влиянии эмпирических методов лечения на продукцию сперматозоидов отмечена тенденция к возрастанию эндогенных уровней Тест при гипергонадотропизме [413]. Приведены данные об эффективности терапии гонадотропинами при гипогонадизме мужчин с азооспермией для последующей микро-ТЕСЕ [162,223,228,347,384].

Вопросы медикаментозной терапии при СК наиболее дискуссионны ввиду позиции о снижении SRR после терапии экзогенным тестостероном, особенно – в инъекционной форме при исходной тяжелой андрогенной недостаточности [191]. Дилемма назначения андрогензаместительной терапии (АЗТ): индукция остановки сперматогенеза после подъема уровня сывороточного тестостерона и снижения ФСГ и ЛГ при высокой потребности организма подростка в развитии органов и систем, контролируемых андрогенами [248,249]. С другой стороны, позднее назначение препаратов тестостерона мужчинам с СК с заместительной целью усугубляет клиническую картину гипогонадизма.

Данные о влиянии заместительной терапии андрогенами на SRR неоднозначны: позиционируется, что при возрастании в исходе лечения уровня тестостерона ($>8,7$ нмоль/л) вероятность получения сперматозоидов при микро-ТЕСЕ (66,0%), ЧО и ЧНБ у мужчин с немозаичной формой СК выше [412].

Согласно недавним исследованиям, использование местных (трансдермальных) андрогенов в сочетании с препаратами ингибиторами ароматазы (ИА) у юношей в возрасте 14-22 лет с СК за 1-5 лет до хирургического извлечения сперматозоидов не приводит в дальнейшем к снижению SRR [463].

Неоднозначность мнений об эффективности ИА при азооспермии обусловлена различной продолжительностью терапии, комбинацией с другими препаратами. Сообщается о большем возрастании уровня эндогенного Тест после применения аримидекса в сравнении с препаратами тестостерона, повышении SRR и изменении качества тестикулярных сперматозоидов [354]. По другим данным, назначение ИА целесообразно при исходно низких значениях сывороточного Тест (<300 нг/дл) и соотношении Тест/Е2 <10 [306,420].

Возрастание эффективности извлечения сперматозоидов у мужчин с СК связывают с терапией гонадотропинами, изолированной или сочетанной с ИА, назначение которых осуществляют в соответствии с исходным уровнем

сывороточного Тест [141,412]. Длительность лечения препаратами тестостерона дискутируется с указанием на целесообразность прекращения их введения за 6–12 мес до начала лечения бесплодия [191,351].

Shiraishi et al. указывают на эффективность повторного ТЕСЕ у мужчин с НОА после отрицательной первой попытки только после курса терапии (5000 МЕ ХГЧ три раза в неделю в течение трех мес) со снижением у половины эндогенного уровня ФСГ. Дополнение при низком уровне ФСГ рекомбинантного гонадотропина в дозе 150 МЕ три раза в неделю в течение двух месяцев позволило добиться большей частоты экстракции сперматозоидов (21%) [223]. Многие исследователи подчеркивают необходимость длительного лечения гонадотропинами при гипогонадотропном гипогонадизме для предоперационной подготовки в течение 6 мес и более. Вероятность появления сперматозоидов в семенных канальцах яичка раньше, чем в эякуляте обосновывает метод ЭКО-ИКСИ-микро-ТЕСЕ для скорейшего наступления беременности [325].

1.5 Исходы программ ЭКО-ИКСИ при мужском факторе, обусловленном разными типами азооспермий

Возможности современной репродуктивной медицины способствовали смене вектора отношения к проблеме ведения ранее считавшихся абсолютно бесплодными мужчин с СК. С момента сообщения в 1998 г. G. Palermo et al. о единичных случаях успешного лечения бесплодия мужчин с немозаичной формой СК за последние 15 лет накоплены данные об их биологическом отцовстве более чем в 150 случаях рождения детей с нормальным кариотипом [90,191,247,411].

Подобные успехи предопределили интерес к хромосомному состоянию зародышевых клеток в яичках, осознание необходимости ПГД с целью исключения риска переноса аномальных эмбрионов.

Данные об исходах циклов ЭКО-ИКСИ в зависимости от формы НОА, методики экстракции сперматозоидов переменны. По одним утверждениям [177], ЧНБ в циклах ИКСИ с использованием сперматозоидов мужчин с НОА

ниже в сравнении с эякулированными и тестикулярными/эпидидимальными при ОА. Согласно другим данным, в отсутствие различий ЧНБ с использованием ТЕСЕ-ИКСИ, живорождаемость в группе с НОА оказалась ниже (21,4% против 37,5%), чем с ОА и эякуляторными сперматозоидами (32,3%)[171]. Наряду с сообщениями о сопоставимой частоте деторождения в парах с ОА (в группах с врожденной непроходимостью протоков (34,4%), вазэктомией (32,2%) и перенесенной инфекцией (36,4%))[346], при НОА показаны худшие при азооспермии неонатальные исходы – по параметрам гестационного возраста и веса плода [118].

Сообщается о сопоставимых показателях ЧИ и ЧНБ в парах с СК и имеющих НОА при нормальном кариотипе – 23%, 39% и 26%, 33% соответственно [418]. Средние показатели ЧНБ в парах с СК у мужчин – 49,7% при SRR в 66% [249], НОА – в 45% [361].

В дискуссиях об исходах циклов ЭКО-ИКСИ сообщается о худших морфологических свойствах, замороженных/оттаянных сперматозоидов в сравнении с нативными (в день или накануне получения ооцитов), снижении ЧО, без существенного влияния на ЧИ и ЧНБ. Так, Schiff J. et al. [359] указали на отсутствие беременности в протоколах с размороженными тестикулярными сперматозоидами мужчин с СК, Vicdan K. et al. [303] – напротив, об одинаково успешных исходах использования свежих или криоконсервированных гамет. Сравнение частоты деторождения в парах с наличием у мужчин ОА показало большую ЧИ и ЧНБ в циклах МЕСА-ИКСИ в сравнении с ПЕСА-ИКСИ при отсутствии существенных различий показателей в протоколах со свежей и замороженной спермой [258]. Применение свежих сперматозоидов, по данным Kanto et al. [197], определяло сопоставимость исходов после микродиссекции яичек, независимо от типа азооспермии. При равной встречаемости в парах типов азооспермии, использование тестикулярных сперматозоидов в день извлечения ооцитов (в 166 циклах), за день до (n=42), замороженных/оттаянных (n=129) обеспечили оплодотворение в 70,7%, 68,7% и 67,3%, ЧНБ – в 31,3%, 30,9% и 25,5%; родов – 28,9%, 28,5% и 23,2% [302].

Влияние гистологической картины на исходы циклов ТЕСЕ-ИКСИ представлено Gul U. et al.: низкой SRR у мужчин с СКС в сравнении с другими формами при НОА (27,6%) соответствовали показатели ЧО, ЧИ и ЧНБ – $60,9 \pm 23,0\%$, $36,5 \pm 41,8\%$ и $51,3\%$ соответственно; частота живорождений на цикл и на пациента – $37,8\%$ и $45,1\%$ соответственно [402].

Приведены данные об отсутствии влияния криоконсервации эпидидимальных сперматозоидов на эффективность программы ЭКО-ИКСИ: использование замороженных тестикулярных сперматозоидов приводило к снижению ЧО, существенно не влияя на ЧИ и ЧНБ.

Эмбрионы, полученные после оплодотворения тестикулярными сперматозоидами мужчин с НОА, чаще имеют морфологические нарушения после двух дней дробления [441]. Ben-Ami I. et al. показали отсутствие существенных различий в ЧО в циклах ЭКО-ИКСИ с криптозооспермией при более высоких показателях (ЧИ – $20,7\%$ против $5,7\%$, ЧНБ – $42,5\%$ против $15,1\%$ и частота живорожденных детей – $27,5\%$ против $9,4\%$) при оплодотворении сперматозоидами, полученными при микро-ТЕСЕ [242].

Детализации факторов, влияющих на частоту живорождений и клинических беременностей при использовании сперматозоидов, полученных с помощью микро-ТЕСЕ и обычной ТЕСЕ, в доступной нам литературе выявлено не было, за исключением отдельных исследований [90].

РЕЗЮМЕ

Остаются неуточненными, фрагментарными и неоднозначными представления об этиологии и патогенезе МБ, обусловленного тяжелыми формами патозооспермии, в том числе – при избыточной массе тела и ожирении. Дискутируются:

- роль нарушений сперматогенеза на геномном и постгеномном уровнях, значимость, наряду с традиционными (патоморфологическое) «тонких» методов исследований в выборке с азооспермией для их диагностики;
- микроделеций генов AZF региона Y хромосомы, полиморфизмах генов *CFTR* и *AR*;

- электронно-микроскопическое исследование тестикулярной ткани;
- иммуноцитохимический анализ синаптонемных комплексов сперматоцитов I порядка;
- возможность экстракции сперматозоидов, пригодных для оплодотворения в программах ЭКО-ИКСИ при немозаичной форме СК методом микро-ТЕСЕ семенных канальцев;
- характер нарушений сперматогенеза в зависимости от особенностей эндокринно-метаболического статуса мужчин с эндокринопатиями и патозооспермией, различных формах азооспермии;
- возможность предикции экстракции сперматозоидов (тестикулярных или эпидидимальных) на основании ряда характеристик эндокринно-метаболического статуса мужчин с азооспермией;
- влияние ИзбМТ и ожирения на фертильность мужчин посредством оценки ультраструктурных нарушений сперматозоидов (ИФ ДНК, НВА-тест) с целью определения тактики лечения бесплодия;
- эффективность метода ЭКО-ИКСИ при различных типах азооспермии с учетом генеза МБ и метода экстракции сперматозоидов;
- оптимальность комплекса диагностических методов с целью оценки структурно-функциональных «поломок» сперматогенеза и способов преодоления МБ различного генеза.

ГЛАВА 2

КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННЫХ МУЖЧИН С АЗОСПЕРМИЕЙ

2.1. Динамика спермиологических показателей бесплодных мужчин, обратившихся в отделение ВРТ в период 2009 – 2016 гг.

Частота азооспермии в исследуемые сроки варьировала в пределах 4,2-10,4% с наибольшим показателем в 2015 г. (Рисунок 2.1).

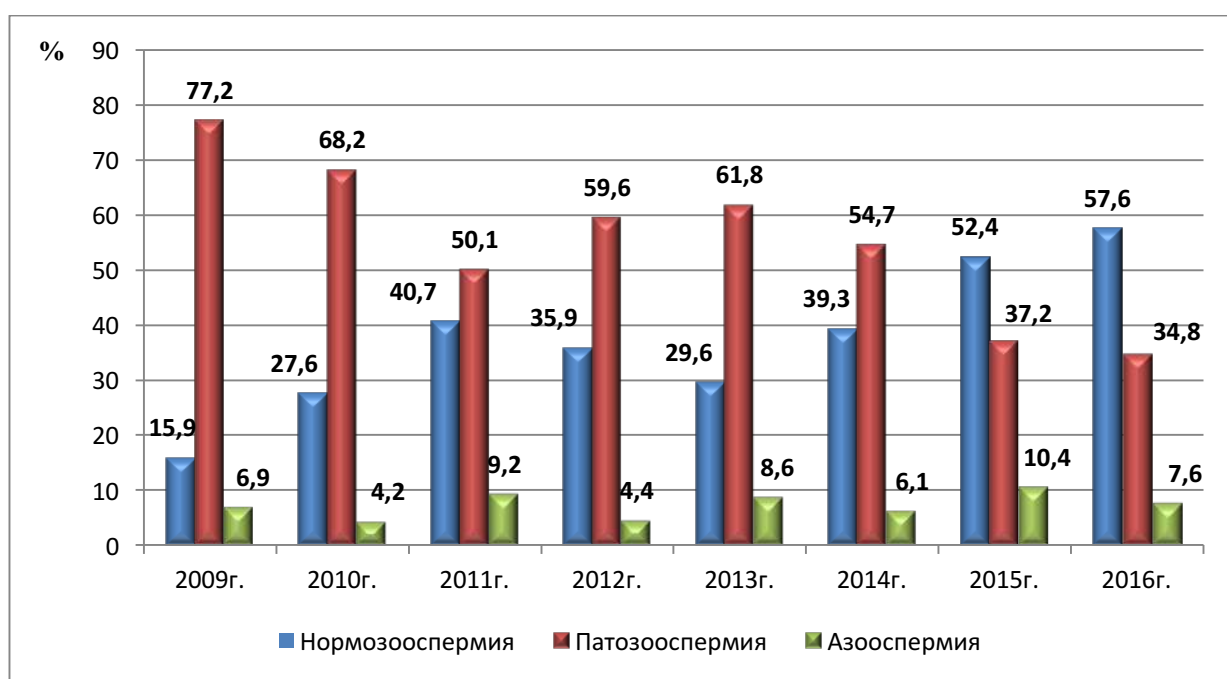


Рисунок 2.1 — Структура спермограмм мужчин в бесплодном браке, обратившихся в отделение ВРТ за период 2009-2016 гг. (на количество обращений) (n=4655).

Уровень патозооспермии оказался наибольшим в 2009 г. (77,2%), снизился до 50,1% - в 2011 г., с последующим приростом к 2013 г. до 61,8%.

В диапазоне 2014-2016 гг. отмечено снижение показателя к 2016 г. до 34,8%.

Тенденция обращения за медицинской помощью мужчин в супружеских парах с нормозооспермией прогрессивно возрастала с 2009 до 2011 г. – в 2,5 раза, с разбросом показателей от 29,6% до 39,3% в 2013-2014гг.

Динамика нормозооспермии в 2015-2016 гг заключалась в приросте до 57,6% - практически в полтора раза с 39,3% в 2014 г.

Совокупные данные о встречаемости аномальных спермограмм в течение 2009-2016 гг. представлены на Рисунке 2.2.



Рисунок 2.2 — Суммарные показатели спермограмм бесплодных мужчин, обратившихся в отделение ВРТ за период 2009-2016 гг. (n=4655).

Встречаемость азооспермии (7,3%) среди аномальных спермограмм оказалась в пять раз меньше, чем нормозооспермии (39,2%), более чем половина бесплодных мужчин страдали патозооспермией (53,5%).

2.2. Клиническая характеристика обследованных мужчин с азооспермией

Анализ распределения бесплодных мужчин по возрастным категориям показал следующую зависимость: среди 20-29-летних в большинстве оказались представители с НОА (34,3%) и 17,1% - с ОА ($p < 0,001$). В группу 30-34-летних вошли практически половина (47,6%) мужчин с НОА, что в шесть раз больше, чем с ОА (7,9%, $p < 0,001$), четверть – со смешанной азооспермией ($p = 0,004$ и $p = 0,003$ – в сравнении с ОА и НОА соответственно).

Количество представителей со смешанной азооспермией в категории 20-29 лет и 30-34 года было сопоставимо – 25,3% (Таблица 2.1).

Таблица 2.1 — Возраст обследованных мужчин

Группы		N	20-29	30-34	35-39	40-44	45 и >
Азооспермия обструктивная	абс.	76	13	6	23	22	12
	%		17,1	7,9	30,3	28,9	15,8
Азооспермия необструктивная	абс.	105	36*	50*	14*	5*	0
	%		34,3	47,6	13,3	4,8	0,0
Азооспермия смешанная	абс.	79	20	20* ^{***}	24**	10*	5
	%		25,3	25,3	30,4	12,7	6,3
			* < 0,001	* < 0,001	* 0,006	* < 0,001	
				* 0,004 ** 0,003	** < 0,001	* 0,036	

Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА; ** - от группы с НОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Среди 35-39-летних количество мужчин с ОА и смешанной азооспермией оказалось сопоставимо больше, чем в группе с НОА (13,3%)($p = 0,006$ и $< 0,001$ соответственно). К старшей возрастной категории – 40-44 года принадлежали 28,9% мужчин с ОА и 8,7% в среднем – представителей остальных групп ($< 0,001$ и $p = 0,036$ соответственно). Количество мужчин 45 лет и старше в группе с ОА составило 15,8%, смешанной азооспермией – 6,3%, однако без статистически значимых отличий.

Данные о среднем возрасте обследуемых бесплодных мужчин представлены в Таблице 2.2.

Таблица 2.2 — Средний возраст мужчин с азооспермией

Группы	N	Средний возраст	Минимальный	Максимальный	Стандартное отклонение
Азооспермия обструктивная	76	36,0	22	48	4,2
Азооспермия необструктивная	105	32,0	20	42	2,5
Азооспермия смешанная	79	35,4	24	47	3,6

$p > 0,05$

Средний возраст мужчин с оказался сопоставим: при ОА – 36,0±4,2 года, НОА – 32,0±2,5 лет, смешанной азооспермии – 35,4±3,6 лет.

Длительность бесплодного брака при наличии мужского фактора представлена в Таблице 2.3.

Таблица 2.3 — Продолжительность бесплодного брака

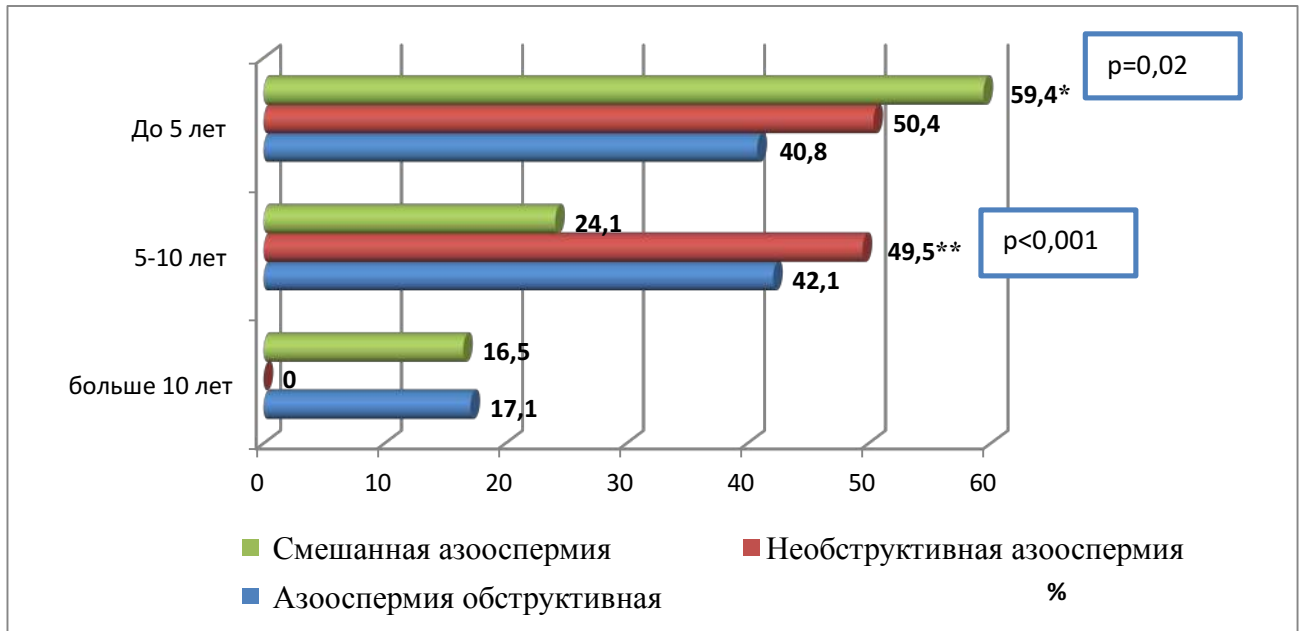
Группы		N	> одного года < двух лет	2 года	3 года	4 года	5 -10 лет	Больше 10 лет
Азооспермия обструктивная	абс.	76	6	6	6	13	32	13
	%		7,9	7,9	7,9	17,1	42,1	17,1
Азооспермия необструктивная	абс.	105	5	37*	5	6*	52	0
	%		4,8	35,2	4,8	5,7	49,5	0,0
Азооспермия смешанная	абс.	79	10	18*	14**	5	19*’**	13
	%		12,7	22,8	17,7	6,3	24,1	16,5
				* <0,001		* <0,014		
				* <0,001	** 0,005		* <0,001 ** <0,001	

Примечание * (p<0,05) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, ** - от группы с НОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Доля мужчин, находящихся в бесплодном браке до включения в программы ВРТ интервалом «более одного года, но менее двух» составила 8,5%; два года – преобладала в группе с НОА (35,2%) – в полтора раза, чем при смешанной азооспермии (22,8%)(p<0,001) и практически в четыре – НОА (p<0,001). Трех- и четырехлетняя длительность бесплодного брака отличала преимущественно мужчин со смешанной азооспермией (17,7%) и ОА (17,1%) в сравнении с НОА (4,8%, p=0,005 и 5,7%, p=0,014, соответственно). Продолжительность бесплодия в 5-10 лет оказалась наименьшей у мужчин со смешанной азооспермией (24,1%), в два раза больше – в остальных группах (45,8%, p<0,001). Бесплодие более 10 лет отмечали в группах с ОА и смешанной азооспермией (16,8% в среднем). Минимальная

продолжительность бесплодия в выборке мужчин с азооспермией составила один год, максимальная – 12 лет.

Суммация данных по длительности бесплодия показала (Рисунок 2.3): интервал до 5 лет преобладал при смешанной азооспермии (59,4%) и в полтора раза меньше – в группе с ОА (40,8%, $p=0,02$).



Примечание * ($p<0,001$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, ** - от группы со смешанной азооспермией, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний) ($n=260$).

Рисунок 2.3 — Варианты азооспермии при различной продолжительности бесплодия в браке (поинтервальные градации).

В выборке с интервалом бесплодия в 5-10 лет наибольший показатель отмечен при наличии НОА (49,5%), что отличало его от группы со смешанной азооспермией практически в два раза (24,1%, $p<0,001$).

Доля пациентов с первичным бесплодием оказалась большей при НОА – 97,1% против 83,2% в остальных группах ($p<0,001$ с ОА, $p=0,006$ – смешанной азооспермией)(Таблица 2.4).

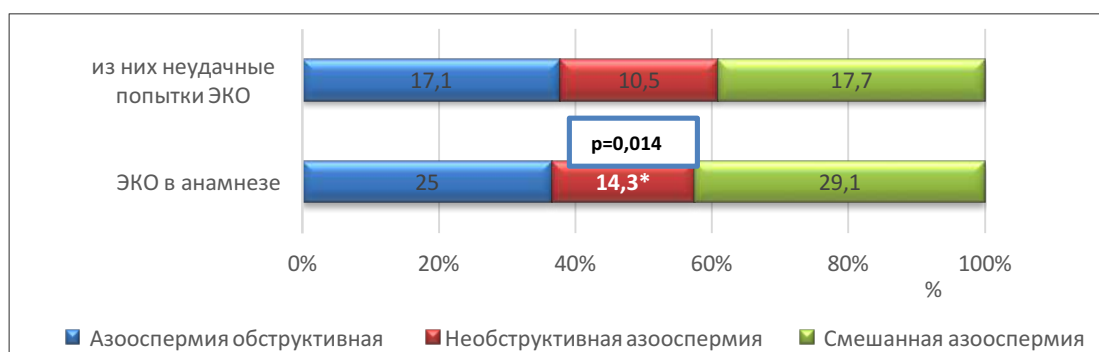
Таблица 2.4 — Паритет бесплодия и показатель наличия генетических детей

Группы		N	Бесплодие первичное	Бесплодие вторичное	Генетические дети в браке
Азооспермия обструктивная	абс.	76	61	15	8
	%		80,3	19,7	10,5
Азооспермия необструктивная	абс.	105	102*	3*	3
	%		97,1	2,9	2,9
Азооспермия смешанная	абс.	79	68**	11**	11
	%		86,1	13,9	13,9
			* < 0,001	* < 0,001	
			** 0,006	** 0,006	

Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, ** - от группы с НОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Вторичное бесплодие чаще всего имело место практически у каждого пятого мужчины с ОА (19,7%), реже встречалось при НОА (2,9%, $p < 0,001$) в сравнении со смешанной азооспермией – 13,9% ($p = 0,006$). Наличие генетических детей в текущем или предыдущем браке выявлено у 2,9% мужчин с НОА и 12,2% - в остальных группах.

Суммарная частота обращений пар в программы ЭКО-ИКСИ по поводу бесплодного брака, связанного с мужским фактором, составила 27% в среднем при смешанной азооспермии и ОА и 14,3% – НОА ($p = 0,014$) (Рисунок 2.4).

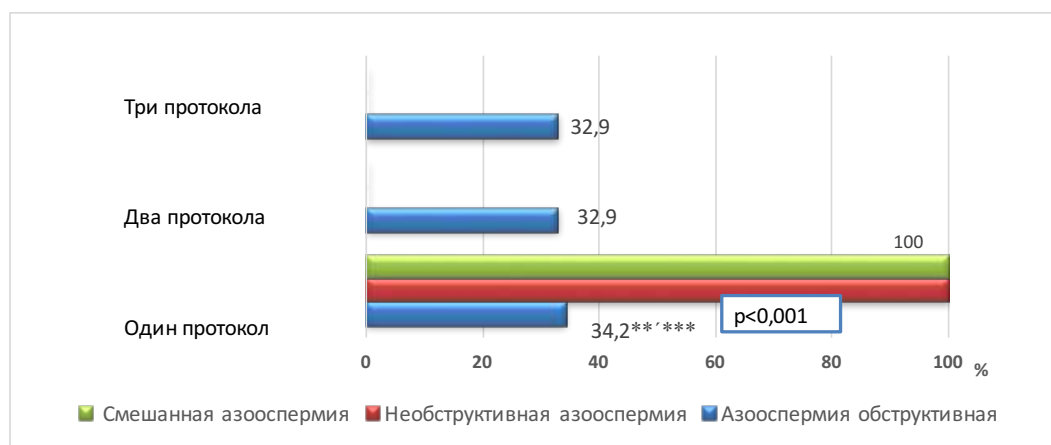


Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, Непараметрический U-тест Манна-Уитни ($n = 57$).

Рисунок 2.4 — Частота вступления в программы ЭКО в анамнезе, из них – с отрицательными результатами.

Неудачные попытки программы ЭКО-ИКСИ (в том числе, закончившиеся неразвивающейся беременностью) имели место у 15,1% мужчин с азооспермией.

Среди обращавшихся супружеских пар к репродуктологам ранее по причине мужского или сочетанного бесплодия, однократное участие в протоколах ЭКО отмечено в парах со смешанной азооспермией и НОА в 100,0% и трети – с ОА ($p < 0,001$) (Рисунок 2.5).



Примечание ** ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с НОА, *** – смешанной азооспермией, Непараметрический U-тест Манна-Уитни ($n=57$).

Рисунок 2.5 — Частота предшествующего участия в программах ЭКО.

Многократное участие в протоколах ЭКО (две, три попытки) наряду с разовым (34,2%) отмечено в группе с ОА ($p < 0,001$) и НОА ($p < 0,001$).

Подавляющее большинство мужчин с азооспермией состояли в первом браке (79,8% в среднем) (Таблица 2.5).

Таблица 2.5 — Распределение мужчин по статусу кратности вступления в брак

Группы		N	Первый брак	Второй брак
Азооспермия обструктивная	абс.	76	55	21
	%		72,4	27,6
Азооспермия необструктивная	абс.	105	93*	12*
	%		88,6	11,4
Азооспермия смешанная	абс.	79	62	17
	%		78,5	21,5
			* 0,006	* 0,006

Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость от группы с ОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Частота повторного брака у мужчин с ОА превосходила показатель при НОА более чем в два раза (27,6% против 11,4%, $p=0,006$). Показатель наличия повторного брака при смешанной азооспермии составил 21,5%.

Антропометрические характеристики бесплодных мужчин с азооспермией приведены в Таблице 2.6.

Таблица 2.6 — Индекс массы тела мужчин с азооспермией

Группы		N	Нормовесные	Избыточная масса тела	Ожирение I степени	Ожирение II степени	Всего с избытком массы тела
Азооспермия обструктивная	абс.	76	34	27	11	4	42
	%		44,7	35,5	14,5	5,3	55,3
Азооспермия необструктивная	абс.	105	64	33	3*	5	41
	%		61,0	31,4	2,9	4,8	39,0
Азооспермия смешанная	абс.	79	43	22	7	7	36
	%		54,4	27,8	8,9	8,9	45,6
					* 0,01		

Примечание * ($p<0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Избыточная масса тела (ИМТ 25–29,9 кг/м²) и ожирение выявлены у 31,6% мужчин с азооспермией: половины с ОА (55,3%) и 42,3% – с другими типами. Ожирение I степени статистически значимо чаще встречалось при ОА (14,5%) в сравнении с группой с НОА (2,9%)($p=0,01$), II степени – у 6,3% всех обследованных. Индекс массы тела, указывающий на нормовесность (18,5-24,9 кг/м²), чаще регистрировали при НОА – у 61%, несколько реже – при ОА - 44,7% против 54,4% при смешанной форме, однако без статистически значимых отличий.

Средний ИМТ в группе с НОА оказался наименьшим, $25,8\pm 2,2$ кг/м² в сравнении с остальными группами ($p<0,05$)(Таблица 2.7).

Таблица 2.7 — Вес мужчин с азооспермией

Группы	N	Средний вес	Минимальный	Максимальный	Стандартное отклонение
Азооспермия обструктивная	76	28,7	26,6	31,2	2,4
Азооспермия необструктивная	105	25,8*	24,7	28,6	2,2
Азооспермия смешанная	79	26,5*	25,2	29,2	1,8
		*<0,01			
		** 0,03			

Примечание * ($p<0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

При ОА показатель ИМТ составил $28,7\pm 2,4$ кг/м², что имело статистически значимые отличия ($p<0,01$ и $p=0,03$).

Распределение бесплодных мужчин по профессиональному статусу представлено в Таблице 2.8.

Таблица 2.8 — Профессиональный статус мужчин

Группы		N	Рабочие	Служащие	Частные предприниматели	Военнослужащие
Азооспермия обструктивная	абс.	76	32	17	20	7
	%		42,1	22,4	26,3	9,2
Азооспермия необструктивная	абс.	105	34	39	25	7
	%		32,4	37,1	23,8	6,7
Азооспермия смешанная	абс.	79	38	16**	17	8
	%		48,1	20,3	21,5	10,1
				** 0,014		

Примечание ** ($p<0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с НОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Представители рабочих специальностей среди бесплодных мужчин встречались: в 32,4% при НОА и 45,1% в среднем – ОА и смешанной

азооспермии. Статус служащих имели более трети мужчин с НОА и каждый пятый (21,3% в среднем, $p=0,014$) с ОА и смешанной азооспермией.

Детализации по профессиональной принадлежности с выделением отдельных специальностей нами не предпринималось ввиду отсутствия статистически значимых отличий.

Частным предпринимательством занимались 23,9% всех мужчин с азооспермией, военнослужащими были 8,7%.

Показатели пристрастий к различным интоксикациям в группах с азооспермией были следующими (Таблица 2.9).

Таблица 2.9 — Приверженность различным интоксикациям мужчин с азооспермией

Группы		N	Курение	Алкоголь	
				эпизодическое потребление – до одного раза в неделю	чаще одного раза в неделю
Азооспермия обструктивная	абс.	76	25	35	3
	%		32,9	46,1	3,9
Азооспермия необструктивная	абс.	105	29	51	5
	%		27,6	48,6	4,8
Азооспермия смешанная	абс.	79	12*	42	3
	%		15,2	53,2	3,8
			* 0,01		

Примечание * ($p<0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Курящими (более пачки в день, стаж в среднем 15 лет) оказались практически треть мужчин (32,9%) с ОА, вдвое меньше – в группе со смешанной азооспермией (15,2%, $p=0,01$), 27,6% - с НОА. Потребление алкоголя в выборке бесплодных мужчин было преимущественно эпизодическим (2-3 раза в месяц) – 49,3% в среднем, причем факт алкогольной интоксикации более раза в неделю (потребление преимущественно пива – по 500 мл или литра, реже – вина) отмечали 4,2%

обследуемых. Наркотической зависимости в выборке мужчин с азооспермией не было.

Оперативные вмешательства в анамнезе имели место у 43,5% мужчин с азооспермией (Таблица 2.10).

Изучение частоты хирургических операций показало преобладание аппендэктомии у мужчин с НОА (21,0% против 6,3% при смешанной азооспермии, $p=0,011$). Паховое грыжесечение практически вдвое чаще отмечали представители группы с ОА (17,1% и 6% соответственно) ($p=0,014$).

Таблица 2.10 — Перенесенные оперативные вмешательства бесплодных мужчин

Группы		N	Аппендэктомия	Оперативное лечение краниофарингиомы	Паховое грыжесечение	Флебэктомия	Холецистэктомия	Стентирование мочеточника
Азооспермия обструктивная	абс.	76	0	0	13	0	0	0
	%		0,0	0,0	17,1	0,0	0,0	0,0
Азооспермия необструктивная	абс.	105	22	1	6*	0	0	0
	%		21,0	1,0	5,7	0,0	0,0	0,0
Азооспермия смешанная	абс.	79	5**	0	5	3	5	1
	%		6,3	0,0	6,3	3,8	6,3	1,3
					* 0,014			
			** 0,011					

Примечание * ($p<0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, ** - от группы с НОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Холецистэктомия, флебэктомия и стентирование мочеточника встречались в группе со смешанной азооспермией, операция по поводу краниофарингиомы – при НОА (1%).

Экстрагенитальная заболеваемость бесплодных мужчин представлена в Таблице 2.11.

Таблица 2.11 — Экстрагенитальные заболевания мужчин с азооспермией

Группы		N	Болезни органов дыхания	Болезни органов пищеварения	Болезни системы кровообращения	Болезни эндокринной системы	Дисплазия соединительной ткани	Вирусный гепатит В, С	Черепно-мозговые травмы/эпилепсия	Эпидемический паротит	Лимфома Ходжкина в анамнезе
Азооспермия обструктивная	абс.	76	14	26	7	11	0	13	9	13	0
	%		18,4	34,2	9,2	14,5	0,0	17,1	11,8	17,1	0,0
Азооспермия необструктивная	абс.	10	11	17*	12	16	3	0	2	0	1
	%	5	10,5	16,2	11,4	15,2	2,8	0,0	1,9	0,0	1,0
Азооспермия смешанная	абс.	79	10	17	14	5	0	10	10**	10	0
	%		12,7	21,5	17,7	6,3	0,0	12,7	12,7	12,7	0,0
				* 0,005							
								**0,009			

Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, ** - от группы с НОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Болезни органов дыхания в группах с азооспермией встречались у 13,9% мужчин в среднем, желудочно-кишечного тракта – у трети с ОА (34,2%) и 18,8% – остальных групп ($p = 0,005$). Болезни системы кровообращения (артериальная гипертензия, нарушения проводимости ритма, порок сердца с открытым овальным окном) при ОА выявляли у 9,2%, в два раза чаще – при других типах азооспермии (18,8%), однако без статистически значимых отличий.

Болезни эндокринной системы (сахарный диабет, заболевания щитовидной железы) были диагностированы у 14,8% мужчин с ОА и НОА, практически вдвое реже – при смешанной азооспермии (6,3%).

В группе с НОА фигурировал один случай рецидива краниофарингиомы через 5 лет после ее оперативного удаления с развитием пангипопитуитаризма. СД 2 типа (прием инсулинсенситайзеров в среднем в течение 3-5 лет) определяли у двух пациентов с ОА, трех – с НОА, нарушение толерантности к

глюкозе – у двух со смешанной азооспермией. Заболевания щитовидной железы (диффузное увеличение на фоне эутиреоза, гипотиреоз на фоне аутоиммунного тиреоидита) имели место у 9 мужчин с ОА, 13 – НОА, трех – со смешанной азооспермией.

Вирусный гепатит В и С перенесли в анамнезе 14,9% мужчин с азооспермией, кроме представителей с НОА. Черепно-мозговые травмы (в т.ч. и посттравматическая эпилепсия) встречались в анамнезе 12,2% мужчин с ОА и смешанной азооспермией и в единичных случаях – НОА (1,9%)($p=0,009$ в сравнении со смешанной азооспермией). Наличие коллагенозов, обусловленных синдромом дисплазии соединительной ткани, отличало 2,8% мужчин с НОА. Эпидемический паротит перенесли 14,9% мужчин с азооспермией смешанного и обструктивного типа. Случай в анамнезе лимфомы Ходжкина, с курсами химиотерапии отмечен у мужчины с НОА (1,0%).

Детальное изучение заболеваний мочеполовой системы мужчин с азооспермией представлено в Таблице 2.12.

Таблица 2.12 — Заболевания мочеполовой системы

Группы		N	Крипторхизм в анамнезе	Острый орхит, Эпидидимит в анамнезе	Хронический орхоэпидидимит	Хронический простатит/везикулит	Киста придатка яичка	Водянка яичка	Опухоль яичка	Гипоспадия	Анеякуляторный синдром	Монохизм	Гипоплазия семенных пузырьков
Азооспермия обструктивная	абс.	76	6	13	19	38	6	13	0	0	0	4	6
	%		7,9	17,1	25,0	50,0	7,9	17,1	0,0	0,0	0,0	5,3	7,9
Азооспермия необструктивная	абс.	105	15	0	0	5*	0	0	0	5	0	0	0
	%		14,3	0,0	0,0	4,8	0,0	0,0	0,0	4,8	0,0	0,0	0,0
Азооспермия смешанная	абс.	79	23***	14	24	5*	0	0	5	0	5	7	0
	%		29,1	17,7	30,4	6,3	0,0	0,0	6,3	0,0	6,3	8,9	0,0
						*<0,001							
			*<0,001 **0,014			*<0,001							

Примечание * ($p<0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, ** - от группы с НОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Крипторхизм достоверно чаще отмечали мужчины со смешанной азооспермией (29,1%) – в два раза чаще, чем при НОА (14,3%)($p=0,014$) и более чем в три раза – с ОА (7,9%)($p<0,001$). Острый орхит, эпидидимит ранее перенесли 17,4% обследованных мужчин с ОА и смешанной азооспермией, хронический – четверть и 30,4% соответственно. Хронический простатит, везикулит был свойственен каждому второму мужчине с ОА и 5,5% - в остальных группах ($p<0,001$). Киста придатка яичка была ранее выявлена у 7,9% мужчин с ОА, водянка яичка – 17,1%.

Частота доброкачественной опухоли яичка (фибромы) и анэякуляторного синдрома, как и анорхизма оказалась сопоставима – 6,3% в группе со смешанной азооспермией. Монорхизм отмечен у 5,3% мужчин с ОА, 8,9% – смешанной азооспермией, причем в 5 из 7 случаев объем яичка соответствовал нормативным значениям, в двух случаях имела место аплазия яичка с одной стороны и гипотрофия единственного яичка. Гипоплазия семенных пузырьков определена у 7,9% представителей с ОА.

Наличие варикоцеле, как одного из частых факторов, влияющих на нарушение сперматогенеза отмечено в Таблице 2.13.

Таблица 2.13 — Варикоцеле при разных типах азооспермии

Группы		N	Варикоцеле в анамнезе	Варикоцеле на момент обращения	Одностороннее	Двустороннее	Рецидив варикоцеле
Азооспермия обструктивная	абс.	76	6	32	32	0	0
	%		7,9	42,1	42,1	0,0	0,0
Азооспермия необструктивная	абс.	105	26*	37	21*	15	5
	%		24,8	35,2	20,0	14,3	4,8
Азооспермия смешанная	абс.	79	18*	18*	18*	0	5
	%		22,8	22,8	22,8	0,0	6,3
			*0,004		*0,002		
			*0,011	*0,011	*0,011		

Примечание * ($p<0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Встречаемость заболевания в анамнезе оказалась наибольшей в группах с НОА и смешанной азооспермией – у 23,8%, что в три раза чаще, чем с ОА (7,9%)($p=0,004$ и $p=0,011$ соответственно). Показатель варикоцеле на момент осмотра оказался наибольшим в группе с ОА – 42,1%, выявлен у трети с НОА (35,2%) и 22,8% – смешанной азооспермией ($p=0,011$). Одностороннее варикоцеле констатировали при ОА в 42,1%, что вдвое чаще, чем с НОА и смешанной азооспермией (21,4% в среднем)($p=0,002$ и $p=0,011$ соответственно). Удельный вес двустороннего расширения вен семенного канатика составил 14,3% в группе с НОА. Наибольший интерес представляли группы с рецидивом варикоцеле: среди представителей с НОА и смешанной азооспермией их количество составило 5,5%.

Спектр оперативных вмешательств на органах мочеполовой системы представлен в Таблице 2.14.

Таблица 2.14 — Оперативные вмешательства на органах мочеполовой системы

Группы		N	Нефрэктомия + антирефлексная пластика	Операции по поводу варикоцеле	Операции при водянке яичек	Низведение яичек при крипторхизме (орхопексия)	Операции по поводу гнойного эпидидимита	Операции при гипоспадии	Операции при опухолях яичка (орхэктомия)	Орхэктомия (Травмы)	Биопсия яичка	Вазорезекция, вазоэпидидимоанастомоз
Азооспермия обструктивная	абс.	76	1	6	0	0	0	6	0	6	0	6
	%		1,3	7,9	0,0	0,0	0,0	7,9	0,0	7,9	0,0	7,9
Азооспермия необструктивная	абс.	105	0	21*	5	11	0	5	0	0	0	0
	%		0,0	20,0	4,8	10,5	0,0	4,8	0,0	0,0	0,0	0
Азооспермия смешанная	абс.	79	0	5**	0	14	10	0	5	0	10	5
	%		0,0	6,3	0,0	17,7	12,7	0,0	6,3	0,0	12,7	6,3
				*0,025								
				**0,009								

Примечание * ($p<0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, ** - от группы с НОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

В группе с ОА в анамнезе одного пациента фигурировала аномалия развития мочевой системы (удвоение чашечно-лоханочной системы с частичной облитерацией мочеточника с гидронефрозом), потребовавшая выполнения нефрэктомии и антирефлюксной пластики.

Оперативные вмешательства (микрохирургическая субингвинальная варикоцелэктомия по Мармару, перевязка вен гроздевидного сплетения по Иванисевичу) по поводу варикоцеле с одной или двух сторон выполнены всем шести пациентам с ОА, большинству – с НОА (20,0% из 24,8%)(в сравнении с ОА и смешанной азооспермией – $p=0,025$ и $p=0,009$ соответственно). Показатель хирургического лечения варикоцеле в группе со смешанной азооспермией был наименьшим (6,3%), что объясняется выбором в пользу выжидательной тактики с учетом преобладания нетяжелых форм заболевания. Оперативные вмешательства при водянке яичка/чек отмечены у 4,8% мужчин с НОА. Низведение яичек при крипторхизме – паховую ретенцию перенесли 14,1% пациентов со смешанной азооспермией и НОА.

У остальных мужчин с крипторхизмом в группах с азооспермией состоялось спонтанное опущение яичек в мошонку.

Хирургическое вмешательство при гнойном эпидидимите проведено у 12,7% мужчин с ОА, гипоспадии - у 6,3% представителей с НОА и ОА. Следует отметить, что в одном случае операции в связи с гипоспадией были многократными – до 11 раз! Орхэктомия яичка в связи с новообразованием или травмой мошонки – выступавшая причиной развития смешанной и ОА выполнена в 6,3% и 7,9% соответственно. Биопсии тестикул и их придатков ранее отмечены в группе со смешанной азооспермией в 12,7%, в трех случаях – с положительным результатом – сперматозоиды получены, в четырех – биопсии были неоднократными. Вазорезекцию, вазоэпидидимоанастомоз выполняли у 7,1% мужчин с ОА и смешанной азооспермией.

Резюме

- принадлежность представителей с азооспермией к возрастным категориям отличалась: более молодая – мужчин с НОА (20-29-лет (34,3%), 30-34 года (47,6%)) и смешанной азооспермией (81% (20-39 лет)), чем с ОА (старше 35 лет – 75%);
- средний возраст мужчин с ОА составил $36,0 \pm 1,2$ лет, НОА – $32,0 \pm 0,6$ лет ($p < 0,05$), смешанной азооспермией – $35,4 \pm 1,6$ года;
- длительность бесплодного брака при наличии мужского фактора: в большей степени – интервал до 5 лет превалировал при смешанной азооспермии (59,4% против 40,8%) – в полтора раза в сравнении с ОА; в 5-10 лет при НОА – 49,5%, ОА – 42,1%; смешанной азооспермии и ОА – 16,8% - более 10 лет;
- большая частота первичного бесплодия при НОА (97,1% против 83,2% при ОА и смешанной азооспермии);
- участие в протоколах ЭКО/ИКСИ в анамнезе – у 27% мужчин со смешанной азооспермией и ОА, 14,3% – с НОА; многократное – в группе с ОА (34,2%), разовое – 29,1% со смешанной азооспермией и 14,3% – НОА;
- с неудачными исходами – у 15,1% всех обратившихся к репродуктологам;
- приверженность интоксикациям выявлена у 25,2% мужчин с азооспермией, эпизодическое употребление алкоголя – у 49,3%;
- ИМТ мужчин с ОА оказался выше, чем с НОА ($28,7 \pm 2,4$ против $25,8 \pm 2,2$ кг/м²); избыток массы тела установлен у 46,6% мужчин с азооспермией (половины с ОА (55,3%) и 42,3% с другими типами);
- оперативные вмешательства в анамнезе у 43,5% мужчин с азооспермией, чаще – при НОА (21,0% с аппендэктомией) и ОА (17,1% – с паховым грыжесечением);

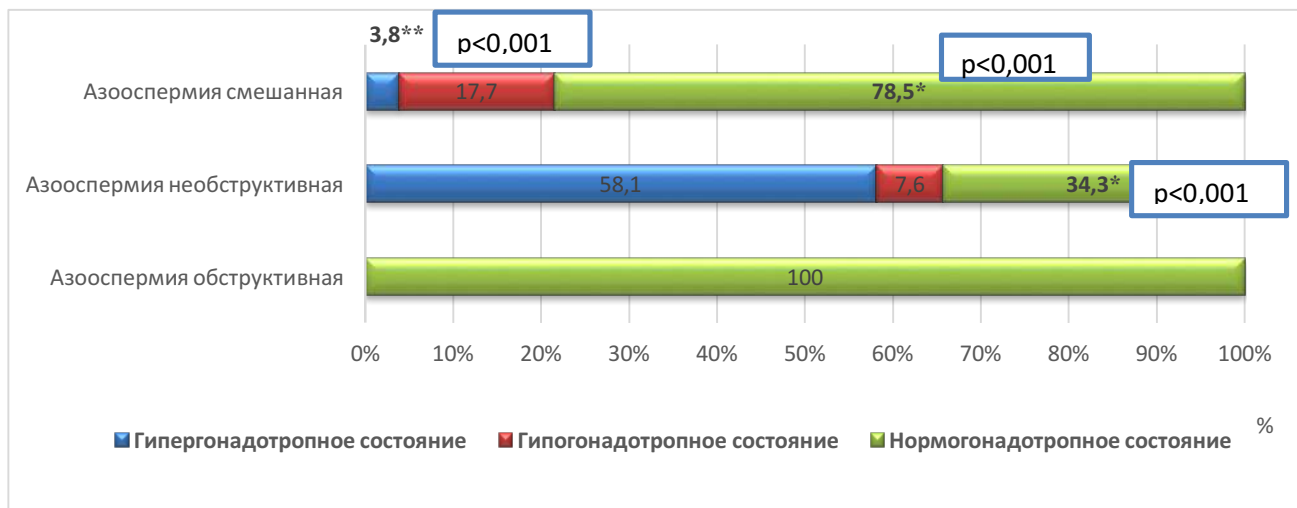
- среди соматических заболеваний преобладали болезни желудочно-кишечного тракта (у 34,2% мужчин с ОА и 18,8% – остальных групп), эндокринной системы – у 14,8% мужчин с ОА и НОА;
- перенесенные заболевания мочеполовой системы мужчин с азооспермией: при ОА – острый и хронический орхоэпидидимит у 42,1%, хронический простатит – 50%, водянка яичек – 17,1%; НОА – крипторхизм – 14,3%; смешанной азооспермии – крипторхизм (29,1%), орхоэпидидимит (48,1%);
- варикоцеле в анамнезе – 23,8% – при НОА и смешанной азооспермии, 7,9% – ОА; рецидив – наибольший при ОА (42,1% против 35,2% – с НОА, 22,8% – смешанной азооспермией);
- оперативные вмешательства при НОА: по поводу варикоцеле (20,0% из 24,8%), водянки яичек (4,8%), крипторхизма – 10,5%; ОА – операции по поводу варикоцеле, гипоспадии, вазорезекция/вазоэпидидимо-анастомоз – с равной частотой (по 7,9%); смешанной азооспермии – крипторхизма, гнойного эпидидимита, биопсия гонад – в 14,4%.

ГЛАВА 3

РЕЗУЛЬТАТЫ ЛАБОРАТОРНО-ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ МУЖЧИН С АЗОСПЕРМИЕЙ

3.1. Результаты гормонального скрининга

По результатам комплексного обследования дана оценка состояния гипоталамо-гипофизарной системы бесплодных мужчин (Рисунок 3.1).



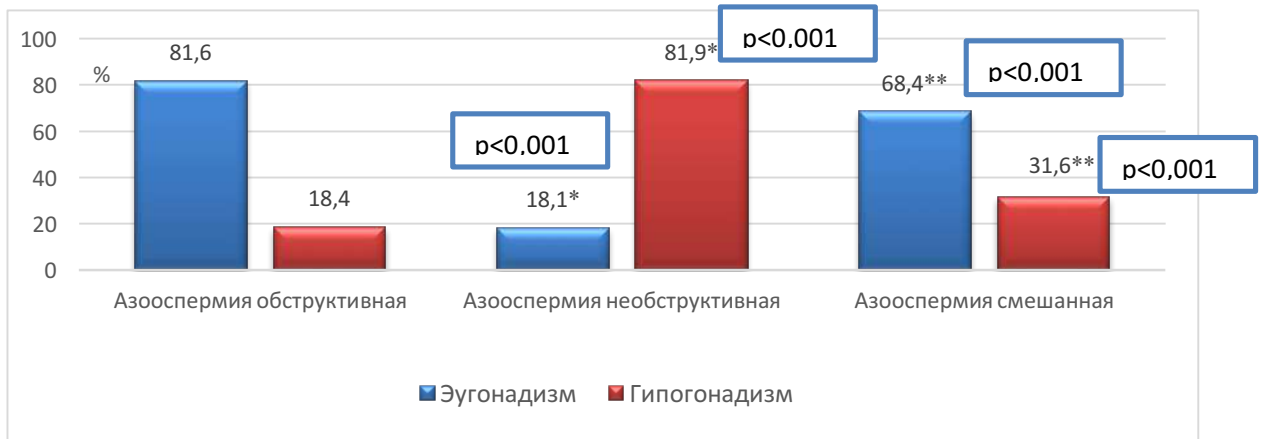
Примечание * ($p < 0,001$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, ** - от группы с НОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Рисунок 3.1 — Особенности состояния мужской репродуктивной системы при азооспермии (n=260).

В зависимости от степени поражения гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси/системы (ГТ-ГФ-ГО) выделяли: гипергонадотропное состояние – у 58,1% мужчин с НОА и 3,8% – со смешанной азооспермией ($p < 0,001$); гипогонадотропное – у 7,6% и 17,7% представителей групп соответственно.

Нормогонадотропное состояние имело место у всех мужчин с ОА (100,0%), 78,5% – со смешанной азооспермией и трети – с НОА ($p < 0,001$).

Распределение вариантов функционального состояния гонад в зависимости от типов азооспермии представлено на Рисунке 3.2.



Примечание * ($p < 0,001$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, ** - от группы с НОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Рисунок 3.2 — Формы функционального состояния гонад в выборке с азооспермией ($n=260$).

Нормальную функцию яичек чаще отмечали у мужчин с ОА (81,6%), каждого пятого с НОА (18,1%, $p < 0,001$) и 68,4% – смешанной азооспермией. Гипогонадизм был выявлен у большинства мужчин с НОА (81,9%), трети – со смешанной азооспермией (31,6%, $p < 0,001$) и реже всего – ОА (18,4%)($p < 0,001$).

Особенности функциональной активности репродуктивной системы бесплодных мужчин представлены в Таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Оценка гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы мужчин с азооспермией

Группы		N	Гипергонадотропное состояние, эугонадизм	Гипергонадотропное состояние, гипогонадизм	Гипогонадотропное состояние, эугонадизм	Гипогонадотропное состояние, гипогонадизм	Нормогонадотропное состояние, гипогонадизм	Эугонадизм
Азооспермия обструктивная	абс.	76	0	0	0	0	14	62
	%		0,0	0,0	0,0	0,0	18,4	81,6
Азооспермия необструктивная	абс.	105	22	39	3	5	17	19*
	%		21,0	37,1	2,9	4,8	16,2	18,1
Азооспермия смешанная	абс.	79	0	3**	0	14	8	54**
	%		0,0	3,8	0,0	17,7	10,1	68,4
				**<0,001				*<0,001
								**<0,001

Примечание * ($p < 0,001$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, ** - от группы с НОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

При гипергонадотропном (чаще изолированной форме по ФСГ или ЛГ) состоянии нормальная функция яичек была отмечена только у 21% мужчин с НОА, гипогонадизм – 37,1% с НОА и 3,8% - со смешанной азооспермией ($p < 0,001$). Пониженный уровень гонадотропинов, сопровождающийся нормальной тестикулярной функцией, был характерен только для 2,9% мужчин с НОА, гипогонадизм – встречался в 17,7% при смешанной азооспермии и 4,8% – НОА. Гипогонадизм при нормальном уровне гонадотропинов был выявлен у 14,9% мужчин с азооспермией. Нормальная тестикулярная функция при нормальном уровне гонадотропинов отличала подавляющее большинство мужчин с ОА (81,6%)($p < 0,001$) и смешанной азооспермией (68,4%). В группе с НОА частота эугонадизма была наименьшей (18,1%).

Объемные характеристики гонад представлены в Таблице 3.2.

Таблица 3.2 — Состояние гонад мужчин с азооспермией

Группы		N	Нормальный объем	Гипотрофия одного яичка	Гипотрофия обоих яичек	Гипоплазия яичек	Уменьшение объема яичек суммарно	Моноорхизм
Азооспермия обструктивная	абс.	76	68	0	8	0	8	4
	%		89,5	0,0	10,5	0,0	10,5	5,3
Азооспермия необструктивная	абс.	105	15*	13	49*	28	62*	0
	%		14,3	12,4	46,7	26,7	59,0	0,0
Азооспермия смешанная	абс.	79	39* ^{***}	18	22* ^{***}	0	40*	7
	%		49,4	22,8	27,8	0,0	50,6	8,9
			* $< 0,001$		* $< 0,001$		* $< 0,001$	
			* $< 0,001$		* $< 0,001$		* $< 0,001$	
			** $< 0,001$		** $< 0,001$		* $< 0,001$	

Примечание * ($p < 0,001$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, ** - от группы с НОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Гипотрофия одного яичка встречалась у 22,8% мужчин со смешанной азооспермией, вдвое реже – при НОА (12,4%), обоих – у 46,7% мужчин с НОА, четверти – со смешанной азооспермией и 10,5% – с ОА ($p < 0,001$). Гипоплазию яичек выявляли только в группе с НОА (26,7%).

Суммарный показатель меньше в сравнении с нормой объема яичек выявлен: у половины мужчин с НОА и смешанной азооспермией (54,8%) и 10,5% – с ОА ($p < 0,001$). Монорхизм имел место у 8,9% мужчин со смешанной азооспермией, в пяти из семи случаев объем соответствовал нормативным значениям, в двух – отмечали гипотрофию единственного яичка.

Данные о среднем объеме яичек представлены в Таблице 3.3.

Таблица 3.3 — Средний объем яичек, мл

Группы	N	Средний вес	Минимальный	Максимальный	Стандартное отклонение
Азооспермия обструктивная	76	18,5	15,5	23,4	4,3
Азооспермия необструктивная	105	8,8*	5,2	11,2	2,4
Азооспермия смешанная	79	12,4	10,8	16,8	2,5
		*0,03			

Примечание * ($p < 0,001$) – статистическая значимость отличий от групп с ОА и НОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Средний объем яичек в зависимости от генеза азооспермии варьировал: наименьший выявлен в группе с НОА ($p = 0,03$).

Суммация данных об объеме яичек представлена в Таблице 3.4.

Таблица 3.4 — Варианты объема гонад

Группы		N	Нормальный объем	Гипотрофия/ гипоплазия яичек
Азооспермия обструктивная	абс.	76	68	9
	%		89,5	11,8
Азооспермия необструктивная	абс.	105	15*	90*
	%		14,3	85,7
Азооспермия смешанная	абс.	79	39* **	40* **
	%		49,4	50,6
			* $< 0,001$	* $< 0,001$
			* $< 0,001$	* $< 0,001$
			** $< 0,001$	** $< 0,001$

Примечание * ($p < 0,001$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, ** - с НОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Нормальный объем яичек выявлен у 89,5% мужчин с ОА, половины – со смешанной азооспермией ($p < 0,001$) и только 14,3% - с НОА.

Данные исследования эякулята мужчин с азооспермией представлены в Таблице 3.5.

Таблица 3.5 — Биохимическое исследование эякулята

Группы	N	α -гликозидаза (>20 МЕД/эяк)	цитрат ($>6,8$ мг/эяк)	фруктоза (>13 ммоль/эяк)
Азооспермия обструктивная	76	12,5 \pm 2,8	6,3 \pm 1,5	9,6 \pm 2,4
Азооспермия необструктивная	105	25,8 \pm 3,6*	17,8 \pm 2,7*	39,4 \pm 8,6*,***
Азооспермия смешанная	79	17,7 \pm 4,2	11,5 \pm 2,8	12,8 \pm 4,5
		* $<0,001$	* $<0,001$	* $<0,001$ <***0,003

Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, *** - со смешанной азооспермией, параметрический метод Стьюдента-Ньюмана-Кейлса и Краскала-Уоллиса

Содержание в эякуляте мужчин с НОА цитрата, фруктозы и α -гликозидазы оказалось выше в сравнении с показателями мужчин с обструктивным генезом азооспермии ($p < 0,001$).

Данные исследования функционального состояния гипофиза и мужских гонад представлены в Таблице 3.6.

Таблица 3.6 — Результаты гормонального исследования мужчин с азооспермией

Группы	N	ЛГ, мМЕ/мл	ФСГ, мМЕ/мл	Ингибин В, пг/мл	Тестостерон общий, нг/дл	ГСПГ, нмоль/л	Тестостерон биодоступный, %	Тестостерон свободный, %	Пролактин, мМЕ/мл	Эстрадиол, пг/мл	Соотношение Тестостерон общий к эстрадиолу
Азооспермия обструктивная	76	3,9±0,4	4,7±0,7	221,1±44,9	524,92	34,7±4,3	50,1±3,0	2,1±0,1	256±15,5	89,5±14,6	5,86
Азооспермия необструктивная	105	8,8±1,1*	18,6±2,4*	55,9±10,9*	351,9*	40,3±3,0	41,8±1,9*	1,6±0,07	316,4±18,4	104,5±5,7	3,38*
Азооспермия смешанная	79	5,0±0,7	6,5±1,3	117,9±18,1	426,9	36,1±3,7	46,8±3,4	2,0±0,1	322±16,7	84,5±9,54	5,05
		*0,005	*0,025	*<0,001	*<0,001		*<0,001				*<0,001
		*0,07	*0,006	*<0,001	*<0,001		*0,009				*<0,001

Примечание * (p<0,05) – статистическая значимость отличий от всех групп, параметрический метод Стьюдента-Ньюмана-Кейлса и и Краскала-Уоллиса

Средний уровень ФСГ при НОА оказался статистически значимо больше, чем в группах с ОА и смешанной азооспермией, отражая высокую частоту гипергонадотропной формы гипогонадизма ($p=0,005$ и $p=0,07$).

Уровень ЛГ у мужчин с НОА также резко контрастировал с показателями представителей остальных групп ($p=0,025$ и $p=0,006$).

Показатель ингибина В при НОА оказался резко снижен ($p<0,001$), вдвое больше – при смешанной азооспермии и практически в четыре – ОА.

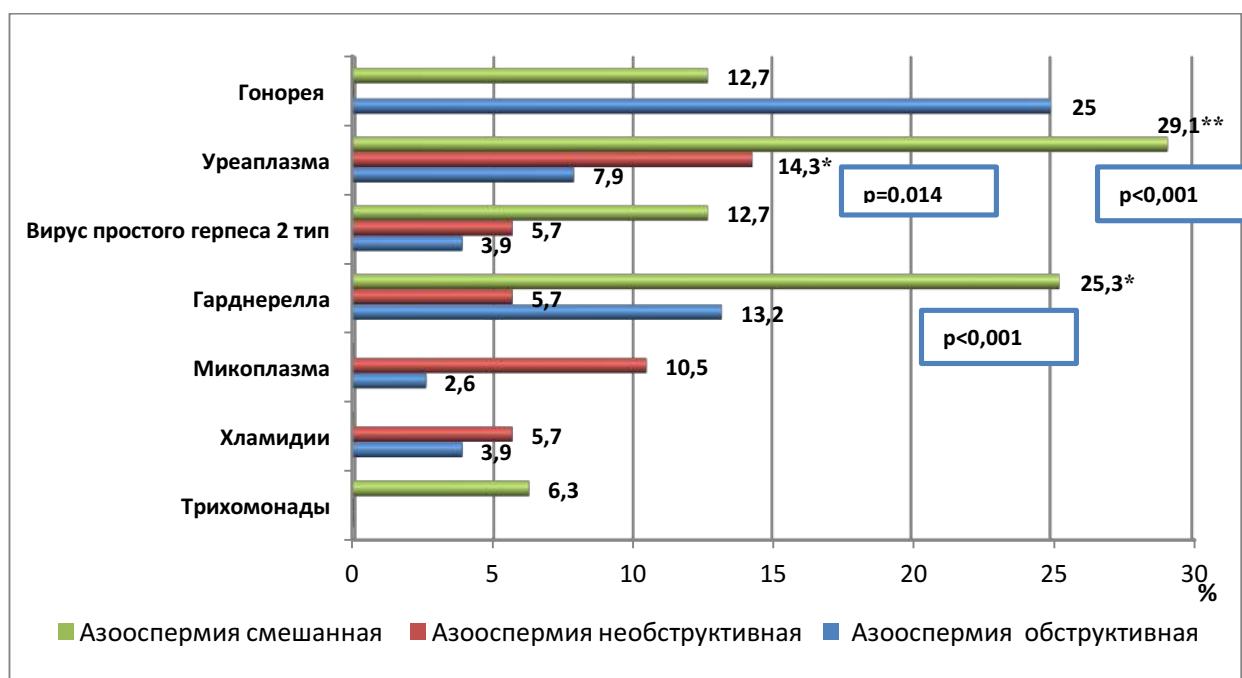
Уровень Тест_{общ}, Тест_{св} и ГСПГ в группах с азооспермией статистически значимо не отличался, биодоступного тестостерона (Тест_{био}) – при НОА оказался ниже, чем в остальных группах ($p<0,001$ и $p=0,009$).

Средние значения пролактина у всех мужчин с азооспермией были в пределах нормативных, как и эстрадиола, несмотря на несколько большую величину при НОА.

Соотношение Тест_{общ}/E₂ в группе с НОА оказалось наименьшим, подтверждая выраженность андрогендефицитного состояния.

3.2. Результаты микробиологического исследования мужчин с азооспермией

Анализ перенесенных половых инфекций представлен на Рисунке 3.3.



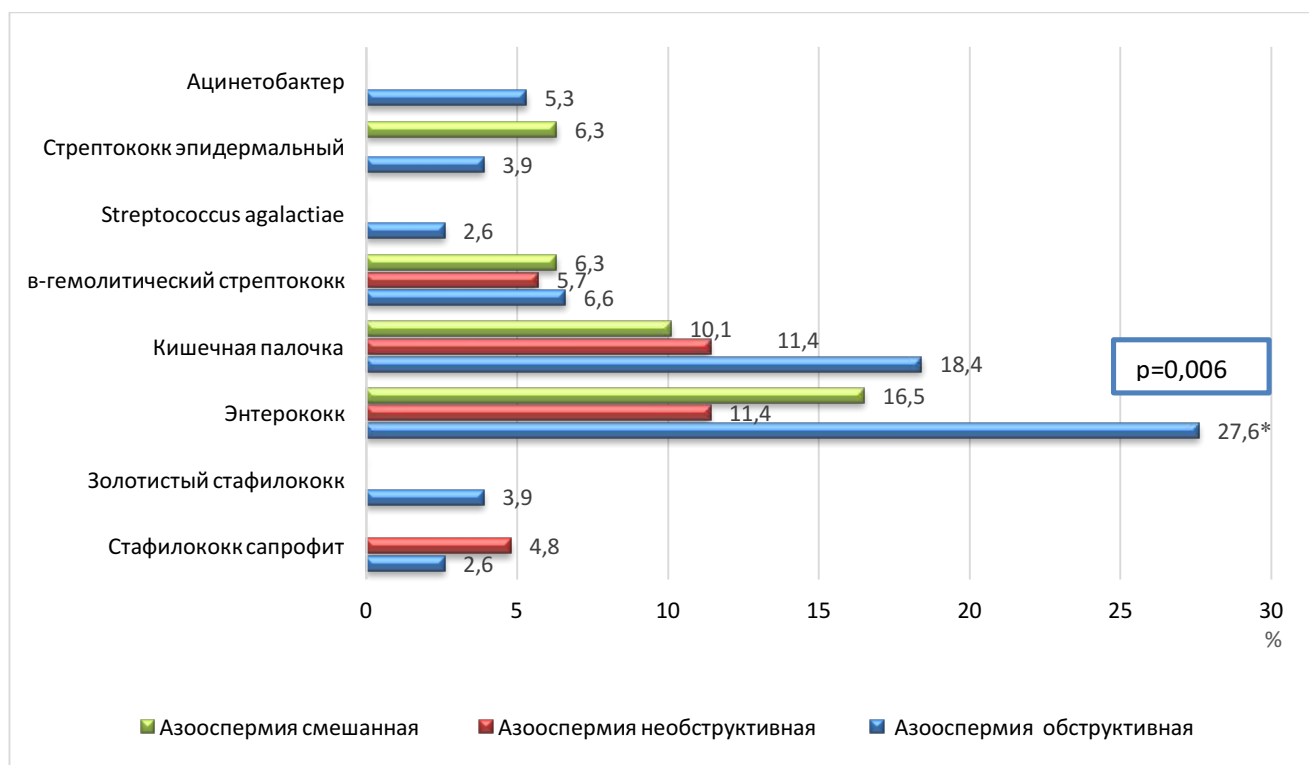
Примечание * ($p < 0,001$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, ** - от группы с НОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Рисунок 3.3 — Перенесенные инфекции, передаваемые половым путем, в выборке мужчин с азооспермией ($n=260$).

Количество мужчин, в анамнезе которых фигурировало инфицирование трихомонадами, составило 6,3% – только при смешанной азооспермии, хламидиями – 4,8% – при НОА и ОА. Частота выявления микоплазм составила 10,5% при НОА и только 2,6% – в группе с ОА. Гарднереллу в диагностически значимых титрах ранее выявляли у четверти мужчин со смешанной азооспермией, вдвое реже – при ОА (13,2%), и только у 5,7% – при НОА ($p < 0,001$). ВПГ 2 типа отмечали у 12,7% мужчин со смешанной азооспермией и 4,8% – другими типами. Уреаплазменная инфекция была пролечена ранее у 29,1% мужчин со смешанной азооспермией – в два раза чаще в сравнении с показателем в группе с НОА ($p < 0,001$) и практически в четыре раза – ОА ($p < 0,001$) (14,3% и 7,9% соответственно). Гонореей переболели четверть мужчин с ОА и 12,7% – смешанной азооспермией.

Бактериологическое исследование эякулята/секрета предстательной железы в выборке бесплодных мужчин с азооспермией показало

инфицирование ее образцов в группе с ОА и смешанной азооспермией в 40,0% и 27,6% – НОА (Рисунок 3.4).



Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Рисунок 3.4 — Структура инфектов по данным бактериологического исследования эякулята/секрета простаты бесплодных мужчин (n=260).

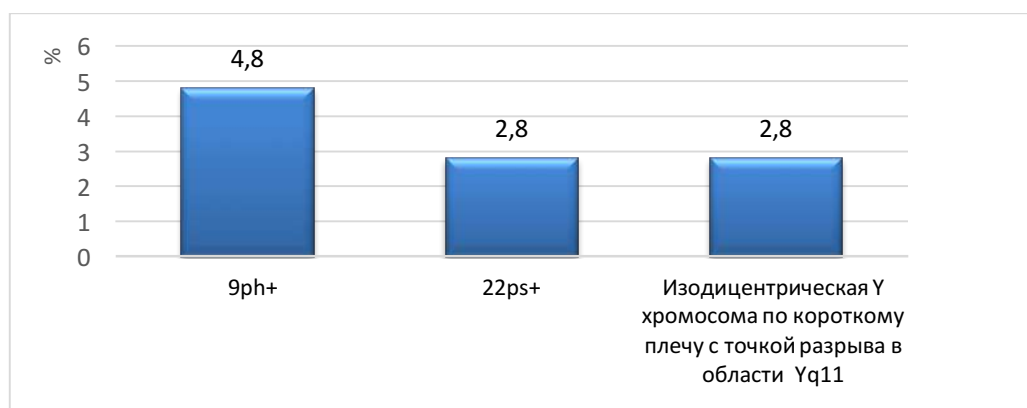
Видовой спектр условно-патогенной микрофлоры в секрете предстательной железы и эякуляте мужчин с азооспермией в диагностически значимых титрах был разнообразен, однако с невысокими показателями. Частота выявления энтерококка у мужчин с азооспермией (19,4%) преобладала при ОА (27,6%) – вдвое больше, чем при НОА (11,4%, $p = 0,006$). Инфицирование эякулята и/или секрета простаты кишечной палочкой при ОА выявлено в 18,4% и 10,7% – в остальных группах. Показатель коагулазонегативных стафилококков и стрептококков оказался невысоким.

Обращает внимание соответствие бактериоспермии данным клинического обследования бесплодных мужчин с хроническими воспалительными заболеваниями половых органов в анамнезе, причем текущее обострение было выявлено у 10,5% представителей с ОА и 7,8% –

смешанной азооспермией, за счет инфектов преимущественно энтеральной группы. Пиоспермию отмечали у 5 мужчин с ОА и 8 – смешанной азооспермией. Микробная контаминация проб эякулята и секрета простаты преобладала при ОА, лейкоспермию и бактериоспермию одновременно выявляли у 31,5% всех обследованных мужчин, со смешанной азооспермией – в 24%.

3.3. Результаты молекулярно-генетического исследования

Исследование кариотипов мужчин с азооспермией показало незначительную частоту полиморфизма хромосом только у представителей группы с НОА (Рисунок 3.5).



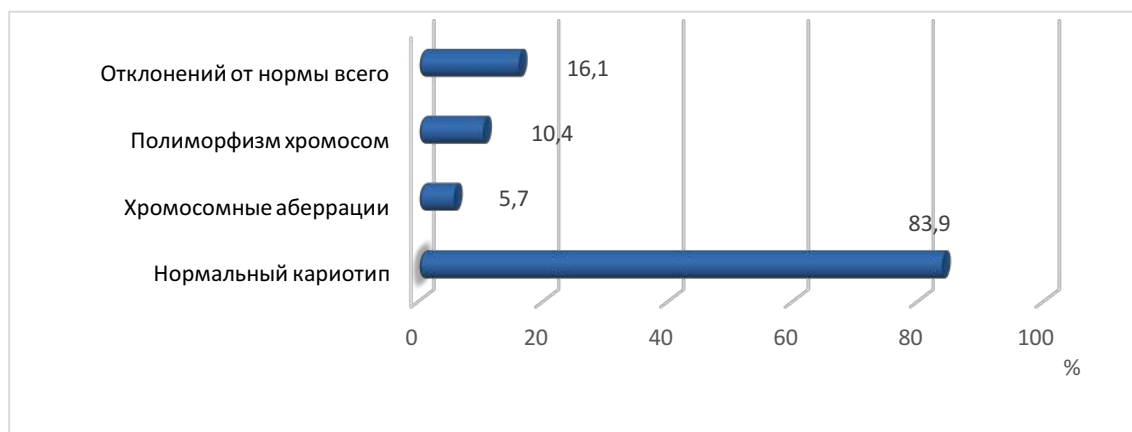
$p > 0,05$

Рисунок 3.5 — Варианты хромосомного полиморфизма мужчин с НОА (n=105).

Полиморфизм 9ph+ среди остальных вариантов изменения размеров гетерохроматиновых участков хромосом встречался в 4,8%. Удельный вес варианта 22ps+ в группе с НОА составил 2,8%.

Вариация в виде изоцентрической Y хромосомы по короткому плечу с точкой разрыва в области Yq11 выявлена в 2,8%.

Суммарное количество числовых и структурных аномалий аутосом и половых хромосом в кариотипе мужчин с НОА составило 16,1% (Рисунок 3.6).



$p > 0,05$

Рисунок 3.6 — Особенности генетического статуса мужчин с НОА (n=105).

Числовые аномалии в системе половых хромосом были представлены немозаичной формой синдрома Кляйнфельтера (кариотип 47,XXY) – у шести мужчин (5,7%) с НОА. Частота случаев хромосомного полиморфизма составила 10,4%.

По результатам молекулярно-генетического анализа AZF региона Y-хромосомы, полиморфизмов генов *CFTR* и *AR* бесплодных мужчин с азооспермией была выявлена значительная частота микроделеций и носительства мутантных полиморфизмов.

Микроделеции в локусе AZF_c встречались у 14,2% мужчин с азооспермией, AZF_{b/b,c} – только при НОА (8,6%)(Таблица 3.7).

Таблица 3.7 — Мутации в AZF регионе Y хромосомы мужчин с азооспермией

Группы		N	Норма	Мутации в AZFc регионе	Мутации в AZFb/b,c регионах	Всего мутаций в AZFb,c регионах	Единичные	Множественные
Азооспермия обструктивная	абс.	76	76	0	0	0	0	0
	%		100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Азооспермия необструктивная	абс.	105	87*	18	9	27	20	7
	%		82,9	17,1	8,6	25,7	19,0	6,7
Азооспермия смешанная	абс.	79	70*	9	0	9**	9	0
	%		88,6	11,4	0,0	11,4	11,4	0,0
			*<0,001					
			*0,004			**0,016		

Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, ** - от группы с НОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Суммарная частота мутаций в AZF регионе составила: при НОА - 25,7%, смешанной азооспермии – практически вдвое меньше (11,4%)($p=0,016$). Доля частичных мутаций составила 19% и 11,4% - при НОА и смешанной азооспермии соответственно.

Множественные микроделеции (полные) имели место у 6,7% мужчин с НОА: в локусах AZFb/b,c (*CY254*, *CY225*; *CY254*, *CY225*, *SY1206*, *SY1291*, *SY1192*) и AZFc (254, 255) – в 2,8% и 3,8% соответственно. У 85,7% представителей групп с НОА и смешанной азооспермией в среднем ($p < 0,05$), всех – с ОА делеции в AZF регионе Y хромосомы не выявлены.

Молекулярный анализ мутаций гена *CFTR* показал их наличие у 19,0% мужчин со смешанной азооспермией и вдвое меньше – в остальных группах (9,6%)(Таблица 3.8).

Таблица 3.8 — Полиморфизмы гена *CFTR* у мужчин с азооспермией

Группы		N	<i>CFTR</i> норма	<i>CFTR</i> T7/T9	<i>CFTR</i> T7/T7	<i>CFTR</i> T7/T5	Всего мутаций гена
Азооспермия обструктивная	абс.	76	70	0	3	3	6
	%		92,1	0,0	3,9	3,9	7,9
Азооспермия необструктивная	абс.	105	93	0	8	4	12
	%		88,6	0,0	7,6	3,8	11,4
Азооспермия смешанная	абс.	79	64	13	0	2	15
	%		81,0	16,5	0,0	2,5	19,0

$p > 0,05$

Мутации в гене трансмембранного регуляторного белка муковисцидоза *CFTR* с полиморфизмом 5T/7T встречались у 3,4% всех бесплодных мужчин с азооспермией, T7/T7 – 5,7% с НОА и ОА, T7/T9 – 16,5% - со смешанной азооспермией. Отсутствие мутантных полиморфизмов гена *CFTR* имело место у 92,1% мужчин с ОА и 84,8% – представителей остальных групп.

Интерпретация по частоте встречаемости различных мутаций генов в AZF регионе показала: их наибольший удельный вес формировал вариант микроделеции AZFc sY 1192 – при НОА практически в полтора раза чаще, чем при смешанной азооспермии (8,6% против 5,1%)(Рисунок 3.7).



$p > 0,05$

Рисунок 3.7 — Варианты микроделеций в локусах AZF региона Y хромосомы у мужчин с азооспермией (n=260).

Частота микроделеций AZFc 1291 при НОА составила 4,8%, при смешанной азооспермии – в два раза меньше (2,5%). Мутации AZFc 254, 255 встречались только при НОА – 3,8%. Частичные микроделеции в локусе AZFb выявлены в 2,9% случаев. Мутации AZFb,c – частичные и множественные отличали только 5,7% представителей с НОА.

Суммарная оценка встречаемости мутантных полиморфизмов в выборке бесплодных мужчин с азооспермией приведена в Таблице 3.9.

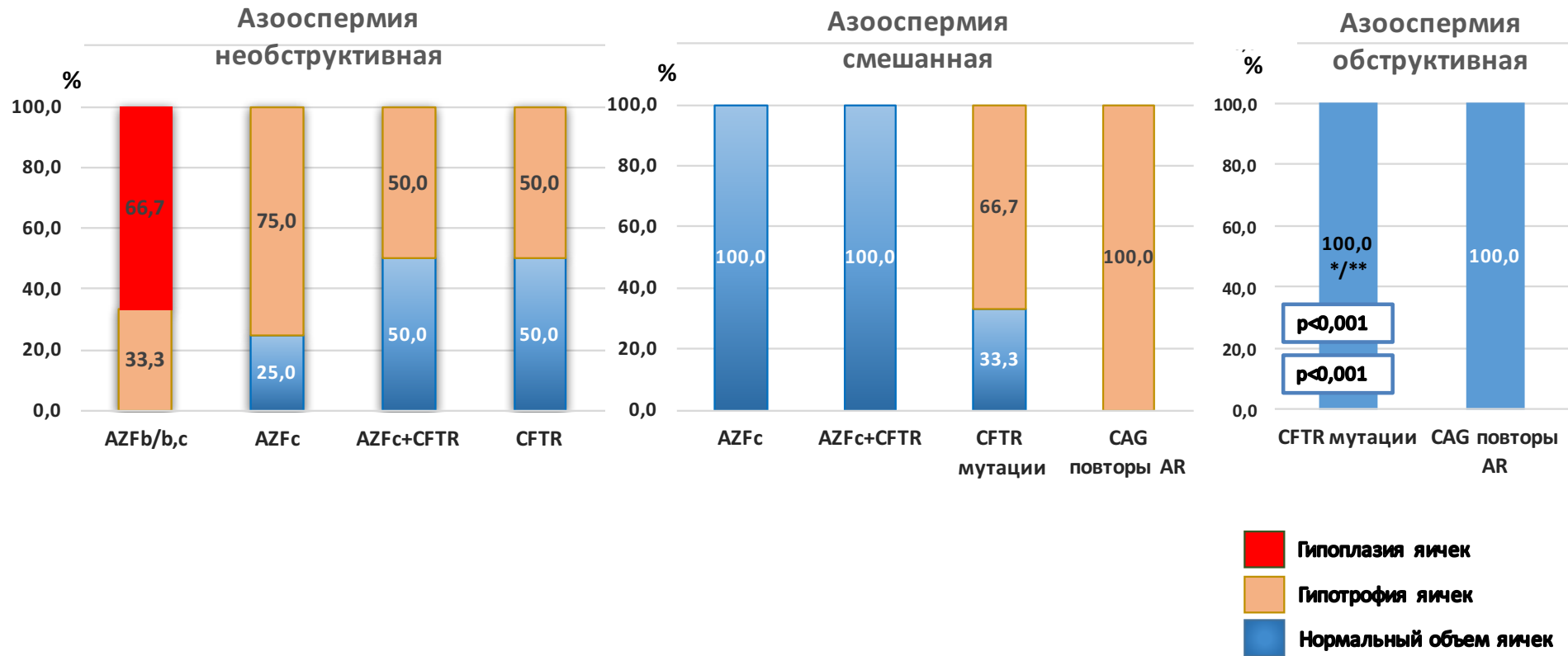
Таблица 3.9 — Типы генетических полиморфизмов у мужчин с азооспермией

Группы		N	Норма	AZF c	AZFb/ b,c	CFTR	AR	Всего мутаций
Азооспермия обструктивная	абс.	76	70	0	0	6	3	9
	%		92,1	0,0	0,0	7,9	3,9	11,8
Азооспермия необструктивная	абс.	105	75*	18	9	12	0	39*
	%		71,4	17,1	8,6	11,4	0,0	37,1
Азооспермия смешанная	абс.	79	56*	9	0	15	3	27*
	%		70,9	11,4	0,0	19,0	3,8	34,2
			*<0,001					*<0,001
			*<0,003					*<0,001

Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Частота мутаций в локусе AZFc составила 14,2% в среднем при НОА и смешанной азооспермии, в AZFb или AZFb,c – 8,6% только у мужчин с НОА. Показатель полиморфизмов в гене CFTR при смешанной азооспермии (19%) в два раза превышал их частоту в остальных группах (9,5%). Встречаемость CAG гена AR составила 3,8% - у представителей с НОА и смешанной азооспермией. Суммарные данные по мутациям генов оказались следующими: 11,8% при ОА и 35,6% – в остальных группах ($p < 0,001$).

При изучении соотношения объема яичек и носительства генетических полиморфизмов/мутаций было установлено: при НОА гипотрофию гонад чаще наблюдали у мужчин с микроделециями субрегиона AZFc (75,0%), мутациями гена CFTR (50,0%) и их комбинациями (50,0%) (Рисунок 3.8).



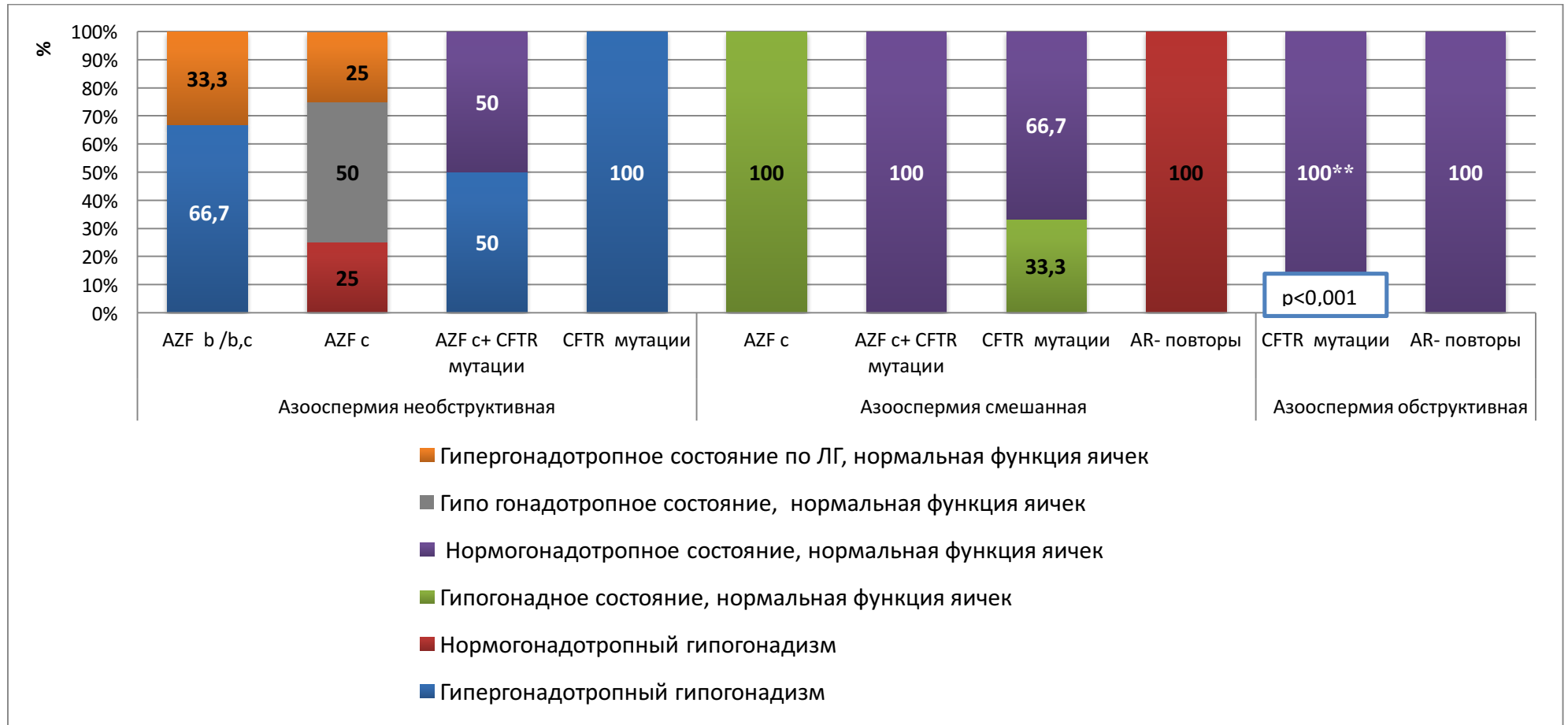
Примечание * ($p < 0,001$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, ** - от группы с НОА

Рисунок 3.8 — Соотношение типов генетических полиморфизмов и мутаций с объемом тестикул ($n=75$).

Гипотрофия яичек реже всего встречалась у носителей мутаций локусов *AZFb/b,c* (33,3%). У остальных представителей группы НОА преобладала гипоплазия тестикул, свойственная только категории мужчин с делециями субрегиона *AZFb/b,c*. Обращает внимание факт наличия нормального объема яичек при различных вариантах мутаций генов *AZF* и *CFTR*, за исключением локуса *AZFb/b,c*.

В группе со смешанной азооспермией гипотрофию яичек имели все мужчины с мутацией гена *AR* (речь о единичных случаях) и *CFTR* (66,7%). Объем гонад, соответствующий нормативным значениям, имел место при делеции локуса *AZFc* и их комбинации с мутацией гена *CFTR* (100%). При изолированном носительстве мутаций гена муковисцидоза *CFTR* гипотрофию яичек констатировали чаще, чем нормальный объем (66,7% против 33,3%). Представителей с ОА и мутациями генов *CFTR* и *AR* отличал объем яичек, соответствующий нормативным значениям ($p < 0,001$).

Соотношение особенностей состояния гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы и вариантов мутаций генов *CFTR* и *AR*, локуса *AZF* Y хромосомы мужчин с азооспермией представлены на Рисунке 3.9.



Примечание ** ($p < 0,001$) – статистическая значимость отличий от группы с НОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

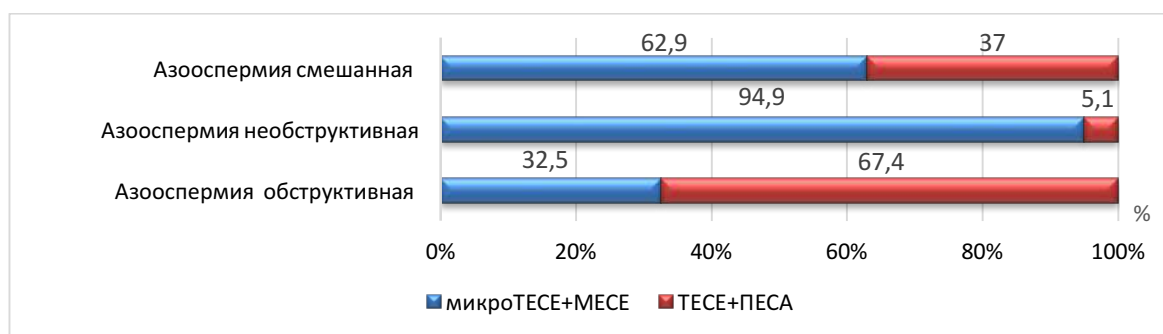
Рисунок 3.9 — Состояние гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы при носительстве полиморфизмов генов AZF, CFTR и CAG-повторов AR у мужчин с азооспермией (n=75).

В группе с НОА при наличии частичных или полных делеций генов в субрегионах *AZFb/b,c* отмечали преобладание гипергонадотропного состояния: с гипогонадизмом – у 66,7%, нормальным объемом тестикул (при изолированном повышении ЛГ) – трети. Носительство частичных микроделеций локуса *AZFc* определяло следующую вариабельность состояния ГТ-ГФ-гонадной системы бесплодных мужчин с НОА: у 75% отмечали нормогонадотропное состояние без нарушения функции яичек, гипогонадотропное состояние – у половины, гипергонадотропное (по ЛГ) – четверти. Оставшуюся четверть носителей мутации гена в локусе *AZFc* отличал нормогонадотропный гипогонадизм.

При изолированной мутации гена *CFTR* все мужчины имели гипергонадотропную форму гипогонадизма, при ее сочетании с микроделецией локуса *AZFc* – только половина. Мужчин со смешанной азооспермией характеризовало наличие гипогонадизма: нормогонадотропного – при мутации гена *AR*, гипогонадотропного – при микроделециях *AZFc* локуса. При сочетании полиморфизмов гена *CFTR* и микроделеции локуса *AZFc* все мужчины имели нормальный уровень Тест, при изолированной мутации гена муковисцидоза – только 66,7%, а у трети был выявлен гипогонадотропный гипогонадизм. При ОА нормальный уровень Тест отличал всех мужчин, независимо от типа полиморфизма в генах *CFTR* и *AR*.

3.4. Результаты пункций бесплодных мужчин с азооспермией

Микрохирургическую биопсию яичка/ек и его придатка в выборке бесплодных мужчин с азооспермией выполняли со следующей частотой: микроТЕСЕ+МЕСЕ – у трети с ОА (32,5%), в два раза больше (62,9%) – при смешанной азооспермии и 94,9% – с НОА (Рисунок 3.10).



$p > 0,05$

Рисунок 3.10 — Методы биопсии тестикул и их придатков при азооспермии различных типов (n=260).

Методы транскутанного извлечения сперматозоидов ТЕСЕ+ПЕСА проводили у 67,4% мужчин с ОА, практически в два раза меньше – при смешанной азооспермии (37%) и только в 5,1% – при НОА.

Эффективность биопсии гонад определена: у всех мужчин с ОА, 97% – со смешанной азооспермией, 50,4% – с НОА, независимо от методов биопсии яичек. В большинстве случаев были обнаружены сперматозоиды, пригодные для использования в программах ЭКО-ИКСИ (Таблица 3.10).

Таблица 3.10 — Результат биопсий тестикул и их придатков

Группы			N	Сперматозоиды	
				получены	нет
Азооспермия обструктивная	микроТЕСЕ+МЕСЕ	абс.	28	28*	0
		%		100,0	0,0
	ТЕСЕ+ПЕСА	абс.	58	58	0
		%		100,0	0,0
Азооспермия необструктивная	микроТЕСЕ	абс.	112	57	55
		%		50,9	49,1
	ТЕСЕ+ПЕСА	абс.	6	3	3
		%		50,0	50,0
Азооспермия смешанная	микроТЕСЕ+МЕСЕ	абс.	68	64*	4*
		%		94,1	5,9
	ТЕСЕ+ПЕСА	абс.	40	40*	0
		%		100,0	0,0
				*<0,001	
				*<0,001	
				*<0,001	*<0,001

Примечание * ($p < 0,001$) – статистическая значимость отличий от группы с НОА, N – количество манипуляций точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний).

Частота отрицательных результатов пункций яичек при НОА оказалась сопоставима с уровнем успешной экстракции сперматозоидов (50,4% против 49,5%), при смешанной азооспермии показатель составил 5,9% только при манипуляции микроТЕСЕ+МЕСЕ ($p < 0,001$).

3.5. Результаты гистологического исследования биоптатов гонад

Возможность гистологического исследования биоптатов яичка определяло наличие материала (интактных семенных канальцев), полученного при пункции у 83,8% мужчин с НОА и 78% – представителей остальных групп (Таблица 3.11).

Таблица 3.11 — Наличие материала для гистологического исследования

Группы		N	Получен	Нет материала
Азооспермия обструктивная	абс.	76	59	17
	%		77,6	22,4
Азооспермия необструктивная	абс.	105	88	17
	%		83,8	16,2
Азооспермия смешанная	абс.	79	62	17
	%		78,5	21,5

$p > 0,05$

Отсутствие ткани семенных канальцев для гистологического исследования по причине невозможности фиксации микроскопически малого объема материала было выявлено в каждом пятом случае (20%).

Оценка состояния ткани яичка проводилась по шкале S.G. Johnsen (распределение степени нарушений сперматогенеза от 1 до 10 баллов) (Таблица 3.12).

Таблица 3.12 — Гистологическое исследование биоптатов яичек (по Johnsen S.G., баллы, 1970, в модификации 2014)

Группы		N	Баллы									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Азооспермия обструктивная	абс.	59	0	0	0	0	5	0	6	0	24	24
	%		0,0	0,0	0,0	0,0	8,5	0,0	10,2	0,0	40,7	40,7
Азооспермия необструктивная	абс.	88	8	8	4	23	10	11	7	13	4*	0
	%		9,1	9,1	4,5	26,1	11,4	12,5	8,0	14,8	4,5	0,0
Азооспермия смешанная	абс.	62	0	0	0	0	0	0	12	28*	18	4*
	%		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	19,4	45,2	29,0	6,5
											*0,001	
										*0,001		*0,001

Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость от группы с ОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

При гистологическом изучении биопсийных препаратов яичек бесплодных мужчин оказалось, что нормальный сперматогенез – 10 баллов в соответствии со шкалой Johnsen S.G. имел место у 40,7% в группе с ОА и 6,5% - смешанной азооспермией ($p < 0,001$) (Рисунок 3.11).

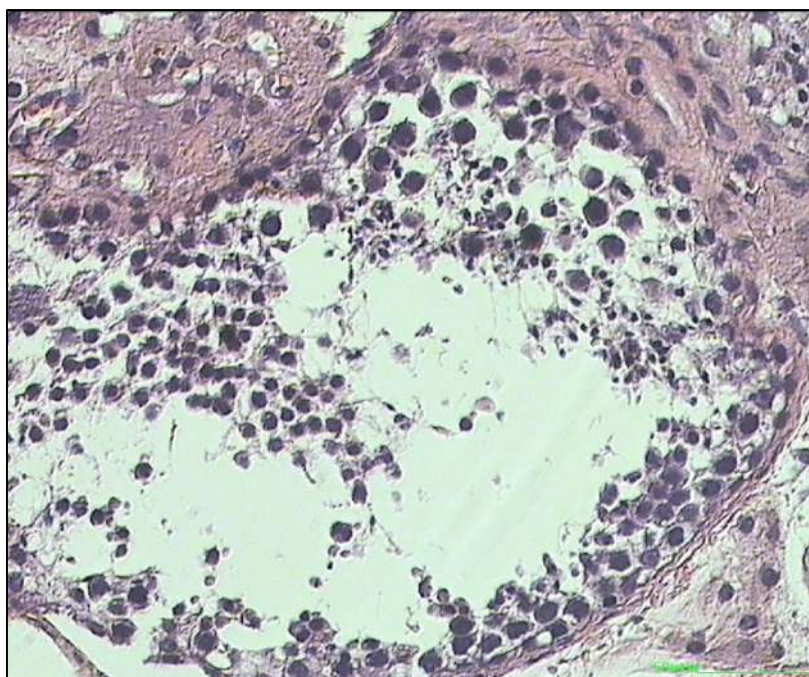


Рисунок 3.11 — Пациент Р.В., 43г. Поперечный срез семенного канальца с сохраненным сперматогенезом. По классификации S.G. Johnsen 10 баллов. Объектив – х40.

Сперматогенез с очагами частичной дезорганизации и десквамации эпителия (9 баллов) наблюдали у 40,7% мужчин с ОА, 29% - смешанной

азооспермией и только 4,5% - НОА. Вариант «сниженного» сперматогенеза с сокращением пула зародышевых клеток (менее пяти сперматозоидов в канальце) и количества поздних сперматид (8 баллов) практически в три раза чаще при смешанной азооспермии, чем НОА (45,2% против 14,8%, $p < 0,001$). Картина коррелировала с наличием очагов фиброза и лимфогистиоцитарной инфильтрации, что было свойственно мужчинам с наличием в анамнезе хронических воспалительных заболеваний гениталий и частичной облитерации семявыносящих протоков (Рисунок 3.12).

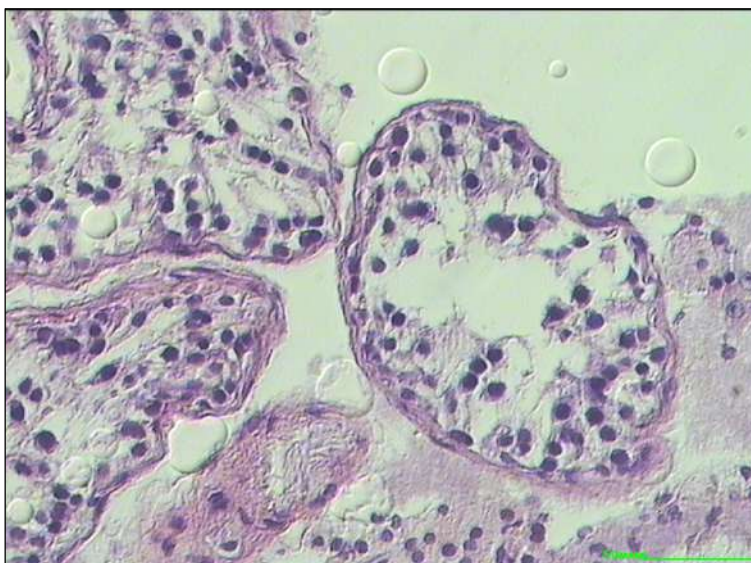


Рисунок 3.12 — Пациент М.В., 29 лет. Гетерогенная картина. Мало поздних сперматид и сперматогенных зон. По классификации S.G. Johnsen 8 баллов. Объектив – х40.

Картину блокады развития зародышевых клеток на уровне сперматид (7 баллов) с преобладанием ранней стадии их развития наблюдали у 19,4% мужчин со смешанной азооспермией и вдвое реже (9,1%) в остальных группах, однако без статистически значимых отличий.

Морфологическая картина соответствия сперматогенеза 6-ти балльной оценке по шкале S.G. Johnsen с резким угнетением продукции пула половых клеток и ранних сперматид имела место только у 12,5% мужчин с НОА; с преобладанием сперматогониев (5 баллов) – у 10% представителей группы с ОА и НОА.

Блок развития зародышевых клеток на уровне сперматоцитов I порядка со значительным сокращением их продукции (4 балла) имел место только при НОА (26,1%)(Рисунок 3.13).

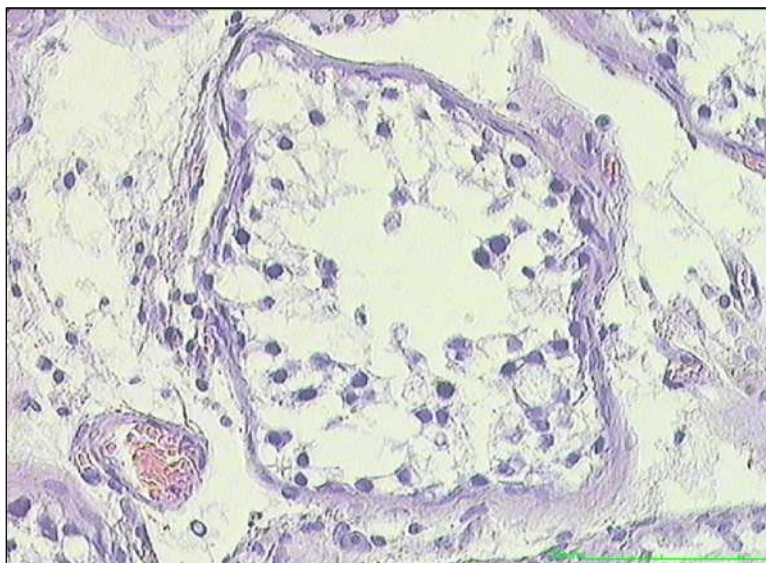


Рисунок 3.13 — Пациент А.М., 27 лет. По классификации S.G. Johnsen 4 балла. Сперматозоиды не получены. Объектив – х40.

Нарушение процессов сперматогенеза на этапе развития сперматогониев было выявлено у 4,5% мужчин с НОА, заключение о СКС (2 балла) на фоне «запустевания» и уменьшения диаметра семенных канальцев, фокального утолщения базальных мембран – у 9,1% (Рисунок 3.14, 3.15).

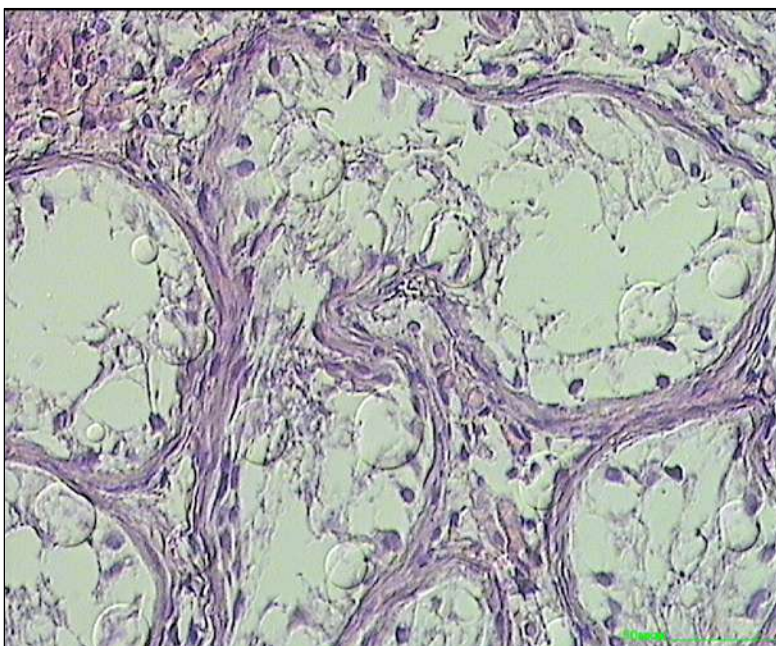


Рисунок 3.14 — Пациент С. А., 26 лет. Сертоли клеточный синдром. По классификации S.G. Johnsen – 2 балла. Объектив – х40.



Рисунок 3.15 — Пациент В.С., 28 лет. Синдром Кляйнфельтера, немозаичная форма. Аплазия герминативного эпителия в канальцах, «тени канальцев» - 1 балл (стрелки). Два круглых канальца – только клетки Сертоли – 2 балла по классификации S.G. Johnsen. Выраженный гиалиноз интерстициальной ткани. Объектив – х40.

У всех мужчин с немозаичной формой СК наблюдали резкую структурную деформацию сперматогенного эпителия (1 балл) с уменьшением в диаметре канальцев, утолщением базальной мембраны, отсутствием клеточного пула, фиброзом стромы и очагами лимфогистиоцитарной инфильтрации (9,1%)(Рисунок 3.16, 3.17, 3.18).

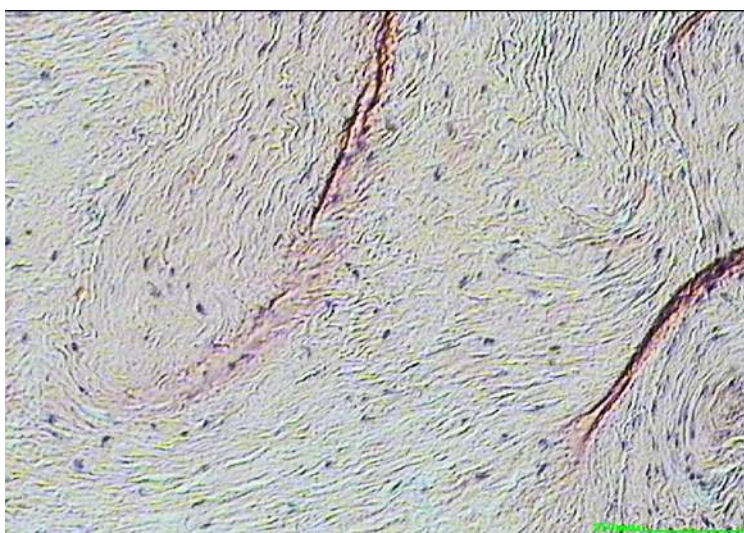


Рисунок 3.16 — Пациент В.В., 43г. Облитерация эпидидимальных канальцев при обструктивной форме азооспермии. Объектив – х40.



Рисунок 3.17 — Пациент Л.Н., 40 лет. Аплазия герминативного эпителия семенных канальцев. Склероз и гиалинизация канальцев отсутствуют. По классификации S.G. Johnsen 1 балл. Объектив – х40.



Рисунок 3.18 — Пациент Ю.А., 28 лет. Синдром Кляйнфельтера, немозаичная форма. Гиалинизация семенного канальца. Объектив – х40.

Интерпретация состояния сперматогенеза у мужчин с азооспермией при гистологическом исследовании по McLachlan R. представлена в Таблице 3.13.

Таблица 3.13 — Гистологическое исследование биоптатов яичек по McLachlan R.

Группы		N	Нормосперматогенез	Гипосперматогенез	Остановка развития герминогенных клеток	Сертоли-клеточный синдром	Гиалинизация семенных канальцев
Азооспермия обструктивная	абс.	59	24	35	0	0	0
	%		40,7	59,3	0,0	0,0	0,0
Азооспермия необструктивная	абс.	88	0	49	28	4	7
	%		0,0	55,7	31,8	4,5	7,9
Азооспермия смешанная	абс.	62	3*	59*'	0	0	0
	%		4,8	95,2	0,0	0,0	0,0
			*<0,001	*<0,001 **<0,001			

Примечание * ($p<0,001$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, ** - от группы с НОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Заключение о гипосперматогенезе было сделано у 57,5% мужчин с ОА и НОА, что практически вдвое меньше, чем при смешанной азооспермии (95,2%)($p<0,001$). Остановку развития герминогенных клеток обнаружили у 31,8% мужчин с НОА. Сертоли-клеточный синдром отметили у 4,5% представителей с НОА, гиалинизацию семенных канальцев – 7,9%.

Нормальный тестикулярный биоптат был выявлен у 40,7% мужчин с ОА и 4,8% - смешанной азооспермией ($p<0,001$). Расхождение заключений о нормосперматогенезе при смешанной азооспермии по классификациям Johnsen и McLachlan составило 1,7% (6,5% и 4,8% соответственно).

При гистологическом исследовании препаратов ткани яичек бесплодных мужчин с азооспермией в части образцов материала были выявлены морфологически различные фокусы, позволяя утверждать о качественно неоднородной картине сперматогенеза – как сохраненных, так и нарушенных его зон.

В Таблице 3.14 представлены варианты балльных оценок образцов гонад в зонах «мозаицизма» и гистологически однородных.

Таблица 3.14 — Варианты гистологических заключений по Johnsen S.G. с учетом гетерогенности и единых балльных оценок

Группы		N	«Мозаицизм»	1 балл	2	3	4	7	8	9	10
Азооспермия смешанная	абс.	59	36*	0	0	0	0	3	3	11	6
	%		61,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,1	5,1	18,6	10,2
Азооспермия необструктивная	абс.	88	68*	7	7	3	3	0	0	0	0
	%		77,3	8,0	8,0	3,4	3,4	0,0	0,0	0,0	0,0
Азооспермия обструктивная	абс.	62	17	0	0	0	0	0	5	17	23*
	%		27,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,1	27,4	37,1
			*<0,001								
			*<0,001								
											*<0,001

Примечание * ($p < 0,001$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Показатель гистологически гетерогенной структуры («мозаицизма») в группах с азооспермией составил: при смешанной азооспермии – 61%, несколько чаще встречался при НОА (77,3%) и только у 27,4% – ОА ($p < 0,001$). Заключение об отсутствии половых и клеток Сертоли в срезах канальцев с тотальной атрофией и десквамацией сперматогенного эпителия на фоне изменения базальной мембраны (1-2 балла) выявлено в 16% образцов тканей мужчин с НОА. Участки материала с остановкой сперматогенеза на уровне сперматогониев (3 балла) выявили у 3,4% бесплодных мужчин, как и единичных сперматоцитов (4 балла)(3,4%). Наличие во фрагментах семенных канальцев ранних округлых сперматид (7 баллов) отмечено у 5,1% мужчин со смешанной азооспермией. Микроочаги сперматогенеза с неполным клеточным составом – единичными сперматозоидами и преимущественно – поздними сперматидами, фрагментарно сохраненным в семенных канальцах эпителием (8

баллов) определили в 6,6% образцов препаратов мужчин со смешанной азооспермией и ОА. Картина преобладания поздних сперматид на фоне очагов десквамированного эпителия канальцев (9 баллов) имела место у 27,4% мужчин с ОА и 18,6% – смешанной азооспермией. Сохранность сперматогенеза с клеточными элементами всех стадий развития была установлена у 37,1% в группе с ОА и 10,2% – смешанной азооспермией ($p < 0,001$).

Выявленное гистологическое разнообразие даже в пределах одного семенного канальца определила вероятность регистрации зон с различной активностью сперматогенеза (балльная оценка приведена для основных зон и очагов) (Таблица 3.15).

Таблица 3.15 — Варианты гистологических заключений с учетом гомо- и гетерогенности зон

Группы		N	Низкие баллы по основным зонам и фрагментам – 1-2/1-6	Низкие баллы по основным зонам и средние – по фрагментам – 1-4/7	Низкие баллы по основным зонам и высокие по фрагментам – 1-5/8-9	Средние баллы по основным и высокие по фрагментам – 6/8	Средние баллы по основным и высокие по фрагментам – 7/8-9	«Мозаицизм» в 3-х зонах – 1/4/8-10	Единая балльная оценка
Азооспермия смешанная	абс.	59	0	0	21	9	6	0	23*
	%		0,0	0,0	35,6	15,3	10,2	0,0	39,0
Азооспермия необструктивная	абс.	88	23	4	23	8	3	7	20
	%		26,1	4,5	26,1	9,1	3,4	8,0	22,7
Азооспермия обструктивная	абс.	62	0	0	11	0	6	0	45**
	%		0,0	0,0	17,7	0,0	9,7	0,0	72,6
									* $<0,001$
									** $<0,001$

Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, ** - от группы с НОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Установлено, что «низкие баллы по основным зонам и фрагментам – «1-2//1-6 баллов» – превалирование на фоне СКС участков семенных канальцев с блоком на уровне сперматогоний/сперматоцитов/ранних сперматид отличали четверть мужчин с НОА (26,1%)(Рисунок 3.19).



Рисунок 3.19 — Пациент П.И., 31г. Слева → – 2-3 балла: клетки Сертоли и сперматогонии; справа ← – 4 балла мало сперматоцитов (по классификации S.G. Johnsen). Гетерогенная картина. Сперматозоиды получены. Беременность не наступила. Объектив – х40.

Вариант «низких баллов по основным зонам и средних – по фрагментам – 1-4//7 баллов» – преобладания субтотальной атрофии семенных канальцев с блоками сперматогенеза на уровне единичных сперматоцитов при немногочисленных фрагментах с сохраненным эпителием и наличием ранних сперматид – отмечен у 4,5% мужчин с НОА (Рисунок 3.20).

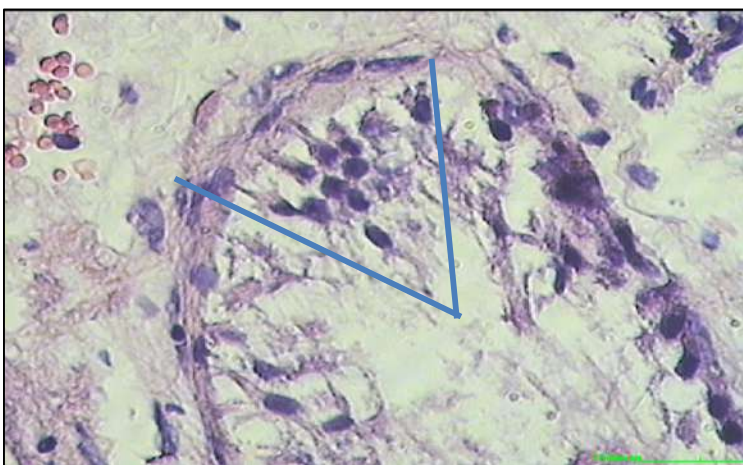


Рисунок 3.20 — Пациент А.В., 28 лет. Семенной каналец с гетерогенной картиной. ∟ Участок с сохраненным сперматогенезом до ранних сперматид. По классификации S.G. Johnsen до 7 баллов на фоне клеток Сертоли. Объектив – х40.

Частота встречаемости гистопрепаратов с «низкими баллами по основным зонам и высокими – во фрагментах – 1-5//8-9 баллов» – доминации блока сперматогенеза на уровне ранних округлых сперматид и скудных участков сохраненного сперматогенного эпителия составила 35,6% – у мужчин со смешанной азооспермией, 17,7% – ОА ($p < 0,001$) и 26,1% – НОА (Рисунок 3.21).



Рисунок 3.21 — Пациент О.В. 41г. Фрагмент извитого семенного канальца с сохраненным сперматогенезом. Сперматозоиды получены. Беременность не наступила. По классификации S.G. Johnsen гетерогенная картина от 5 до 9 баллов. Объектив – х40.

Подобная вариабельность клеточного состава при анализе гистопрепаратов указывает на недостаточную информативность монофокальной тестикулярной биопсии и возможность экстракции сперматозоидов, пригодных для использования и оплодотворения в циклах ВРТ даже при «пограничных» заключениях о резком угнетении сперматогенеза в отдельных участках. Вариант образцов со «средними баллами по основным зонам и высоких – по фрагментам – 6//8 баллов», когда наряду с фокусами семенных канальцев со сперматоцитами 1 и 2 порядка выявляют очаги с незначительным количеством сперматид – ранних и поздних – у 15,3% мужчин со смешанной азооспермией и 9,1% – НОА. Заключения со «средними баллами по основным зонам и высокими по фрагментам – 7//8-9 баллов» –

гетерогенность обусловлены разнородностью клеточного состава в различных участках пунктируемого яичка.

Фокусы с содержанием как ранних сперматид, так и сохранных очагов сперматогенеза с полноценным сперматогенным эпителием были выявлены в 3,4% – при НОА и практически в три раза чаще (10%) – в остальных группах. «Мозаицизм» в трех зонах – «1//4//8-10» был представлен участками склерозированных семенных канальцев, атрофией или гипотрофией сперматогенного эпителия, блоком сперматогенеза на различных уровнях, также – единичных сегментов с сохранным сперматогенезом (Рисунок 3.22).

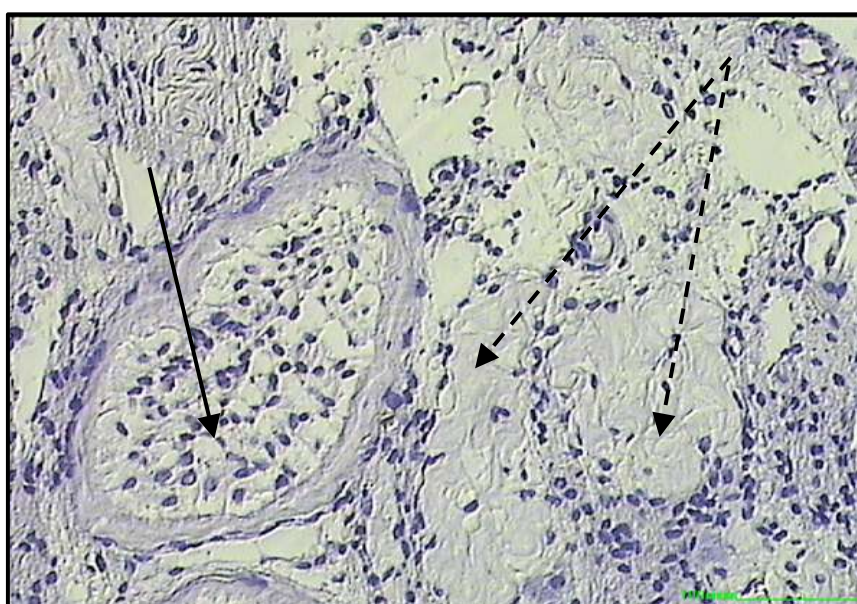


Рисунок 3.22 — Пациент А.И., 23 г. Синдром Кляньфельтера, немозаичная форма.

→ Семенной каналец с сохранным сперматогенезом (10 баллов).

→(пунктир) Тени канальцев – 1 балл по классификации S.G. Johnsen. Объектив – х40.

Поздние сперматиды выделяли у 8% мужчин с НОА. Единая балльная отметка фигурировала в образцах биоптатов 72,6% мужчин с ОА, в два раза меньше – при смешанной азооспермии (39%, $p < 0,001$) и более чем в три раза – при НОА (22,7%, $p < 0,001$).

3.5.1. Результаты гистологического исследования материала яичек в зависимости от наличия и особенностей генетических полиморфизмов

В результате выполнения микро-ТЕСЕ при НОА пригодные для оплодотворения сперматозоиды были получены у половины мужчин с полиморфизмами гена *CFTR*, делецией *AZFc* и их сочетанием (Таблица 3.16).

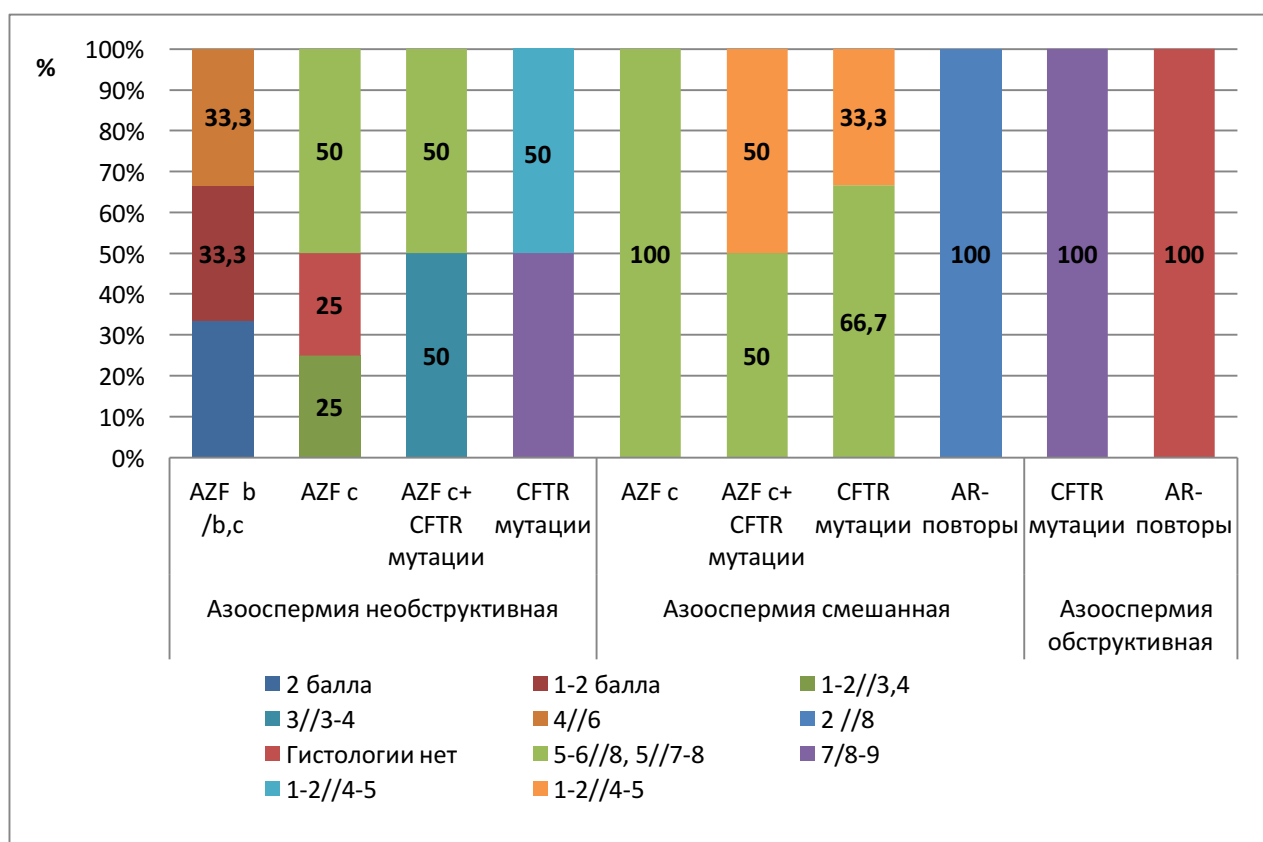
Таблица 3.16 — Методы биопсии яичек и исходы операции по экстракции сперматозоидов

Группы			N	микроТЕСЕ + МЕСА	ТЕСЕ + ПЕСА	Зрелые сперматиды получены	Не получены
Азооспермия необструктивная	AZF b/b,c	абс.	9	9	0	0	9
		%		100,0	0,0	0,0	100,0
	AZFc	абс.	12	12	0	6	6
		%		100,0	0,0	50,0	50,0
	AZFc+ <i>CFTR</i> мутации	абс.	6	6	0	3	3
		%		100,0	0,0	50,0	50,0
	<i>CFTR</i> мутации	абс.	6	6	0	3*	3
		%		100,0	0,0	50,0	50,0
Азооспермия смешанная	AZFc	абс.	3	3	0	3	0
		%		100,0	0,0	100,0	0,0
	AZFc+ <i>CFTR</i> мутации	абс.	6	6	0	6	0
		%		100,0	0,0	100,0	0,0
	<i>CFTR</i> мутации	абс.	9	6	3	9	0
		%		66,7	33,3	100,0	0,0
	AR-повторы	абс.	3	3	0	0	3
		%		100,0	0,0	0,0	100,0
Азооспермия обструктивная	<i>CFTR</i> мутации	абс.	6	3*	3	6	0
		%		50,0	50,0	100,0	0,0
	AR-повторы	абс.	3	3	0	3	0
		%		100,0	0,0	100,0	0,0
						*0,046	

Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА

Отрицательный результат имел место только у носителей делеции субрегиона *AZF b/b,c*. В группе со смешанной азооспермией сперматозоиды были получены при выполнении как микроТЕСЕ, так и ТЕСЕ+ПЕСА при наличии мутаций генов *CFTR* и делеций локуса *AZFc*, *AR*-повторов в группе смешанной азооспермии пункционные биопсии яичек были неэффективными. Представителей с ОА, независимо от варианта генетических мутаций – *CFTR* ($p=0,046$) или *AR*, отличал положительный результат исходов пункций тестикул микроТЕСЕ и ТЕСЕ+ПЕСА.

Исследование биопсийного материала показало вариабельность гистологического разнообразия в зависимости от характера генетических дефектов (Рисунок 3.23).



$p > 0,05$

Рисунок 3.23 — Зависимость генетических полиморфизмов и гистологических особенностей биоптатов тестикул (n=63).

При носительстве *AZFb/b,c* у двух третей мужчин с НОА был выявлен, СКС, трети – гипосперматогенез. При делеции локуса *AZFc* «клеточный арест» – блок сперматогенеза на стадии округлых сперматид наблюдали у четверти представителей группы, половины – гипосперматогенез. Неэффективность забора материала для исследования была отмечена в 25%. Наиболее «благоприятная» гистологическая характеристика имела место при мутации гена *AR* – во всех образцах обнаружили гипосперматогенез.

У представителей со смешанной азооспермией, независимо от вариантов генетических мутаций констатировали наличие очагов завершеного сперматогенеза. Аналогичную картину отмечали при ОА, за исключением мужчин с носительством мутантных аллелей гена *AR* (речь о

единичных случаях), гистологическое исследование у которых не проводили ввиду невозможности забора материала.

У трети мужчин с микроделецией локуса *AZFb/b,c*, выявленной только в группе с НОА, образцы гистопрепаратов оценивали в «1-2 балла», трети – «2 балла», что указывало на очаги деформации сперматогенного эпителия с отсутствием клеточного пула – гистологические маркеры СКС. Еще треть материала характеризовали в «4//6 баллов» за счет одновременного выявления зон с единичными сперматоцитами и участками с небольшим количеством ранних сперматид.

При наличии микроделеции в *AZFc* локусе у четверти мужчин с НОА определяли мозаичные очаги в «1-2//3-4 балла»: превалирование на фоне СКС участков семенных канальцев с блоком на уровне сперматогоний/сперматоцитов. Заключение у половины мужчин с НОА в «5-6//8, 5//8-9 баллов» – вариант гистологического разнообразия указывал на сохранность очагов сперматогенного эпителия при отдельных участках блока сперматогенеза на уровне ранних округлых сперматид. В группе с мутантными полиморфизмами *CFTR* в половине гистологических образцов «1-2//4-5 баллов» отмечена вариабельность от полной аплазии герминогенных клеток и очагового СКС до участков с нарушением вызревания сперматид на ранних стадиях сперматогенеза. Вторую половину представителей группы (50%) с мутациями гена *CFTR* характеризовало заключение в «7//8-9 баллов» – с зонами, включающими ранние сперматиды и сохранные очаги сперматогенеза. При сочетании мутаций генов *CFTR* с микроделециями в *AZFc* локусе половина образцов биоптатов соответствовала «3//3-4 баллам», вторая – с зонами в «5-6//8, 5//8-9 баллов». В группе со смешанной азооспермией оценка в «5-6//8, 5//8-9 баллов» имела место у всех представителей с микроделециями *AZFc*, 66,7% – мутантными полиморфизмами *CFTR*, половины – с сочетанием мутаций *AZFc* и *CFTR*. Заключение о соответствии образца отметке в «9-10 баллов» было выявлено у трети мужчин с полиморфизмами *CFTR* и половины – их сочетанием с

мутациями в *AZFc* локусе. Носительство мутаций гена *AR* отличалось «полярностью» заключений – имелись зоны, указывающие на «2//8 баллов» – соответствия СКС и одновременно – возможности экстракции сперматид, пригодных для оплодотворения в программах ЭКО-ИКСИ. В группе с ОА гистологические заключения были сделаны только для носителей мутации *CFTR*, которым оказалось свойственна оценка в «7//8-9 баллов».

3.6. Результаты электронно-микроскопического исследования сперматозоидов (ЭМИС)

Данные ЭМИС мужчин с азооспермией позволили установить следующие особенности. Содержание головок сперматозоидов с нормальной формой ядра у мужчин с азооспермией составило в среднем 78% (Таблица 3.17).

Таблица 3.17 — Электронно-микроскопическое исследование ядер сперматозоидов мужчин с азооспермией

Группы		N	Нормальная форма ядра	Аномальная форма ядра	Зрелый хроматин	Зрелый вакуолизованный хроматин	Неконденсированный гранулярный хроматин <30%	Содержание сперматозоидов с недостаточно конденсированными Х более 30 %	Нормальное положение акросомы	Аномальная морфология акросомы	Интактные головки нормальной формы с нормальным строением хромосомы и акросомы 4%	Незрелые половые клетки	Отсутствие зрелых клеток	Базальная мембрана многослойная	Базальная мембрана однослойная	Базальная мембрана однослойная утолщенная
Обструктивная азооспермия	абс.	24	20	4	18	6	3	3	24	0	4	0	0	6	17	1
	%		83,3	16,7	75,0	25,0	12,5	12,5	100,0	0,0	16,7	0,0	0,0	25,0	70,8	4,2
Необструктивная азооспермия	абс.	33	25	8	14*	12	6	13*	30	3	3	20	9	24***	3* **	6
	%		75,8	24,2	42,4	36,4	18,2	39,4	90,9	9,1	9,1	60,6	27,3	72,7	9,1	18,2
Смешанная азооспермия	абс.	20	15	5	9	6	6	5	18	2	2	5**	0	5	9	6*
	%		75,0	25,0	45,0	30,0	30,0	25,0	90,0	10,0	10,0	25,0	0,0	25,0	45,0	30,0
					*0,015			*<0,001						*<0,001 **<0,001	*<0,001 **<0,003	
												**0,012				*0,02

Примечание * (p<0,05) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, ** - от группы с НОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Аномальная форма ядра отличала четверть мужчин с НОА и смешанной азооспермией – в среднем, 24,6%, что практически в полтора раза уступало показателю при ОА (16,7%). Зрелость хроматина оказалась в большей степени свойственна представителям с ОА (75%), в полтора раза реже была выявлена в остальных группах (в среднем, 43,7%), что оказалось статистически значимо за счет представителей с НОА ($p=0,015$) (Рисунок 3.24, 3.25).

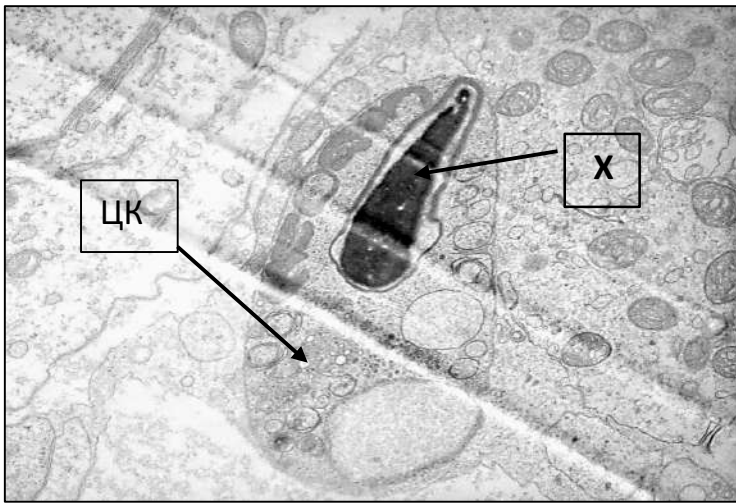


Рисунок 3.24 — Удлиненная сперматида с конденсированным хроматином (X) и цитоплазматической каплей на головке (ЦК).

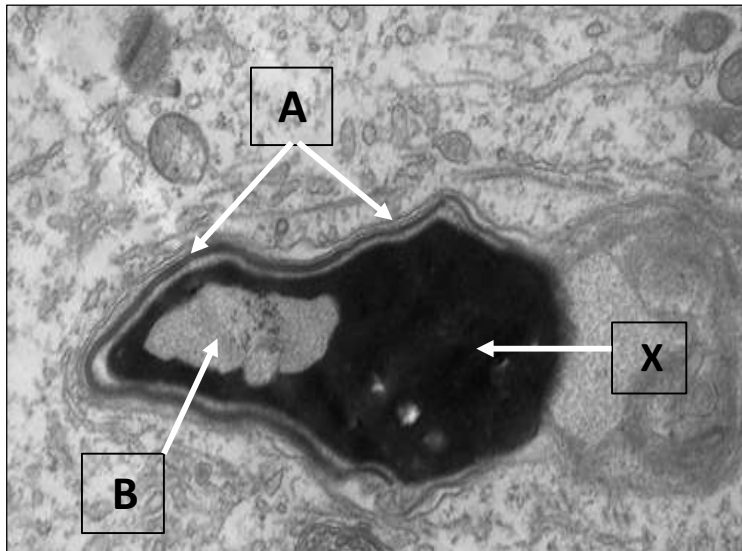


Рисунок 3.25 — Головка зрелой сперматиды с конденсированным хроматином (X) и вакуолью (B). А – акросома.

Достижение компактной консистенции хроматина осуществляется при замене основных белков гистонов на протамины, с превращением округлых сперматид в удлиненные, зрелые спермии (Рисунок 3.26).

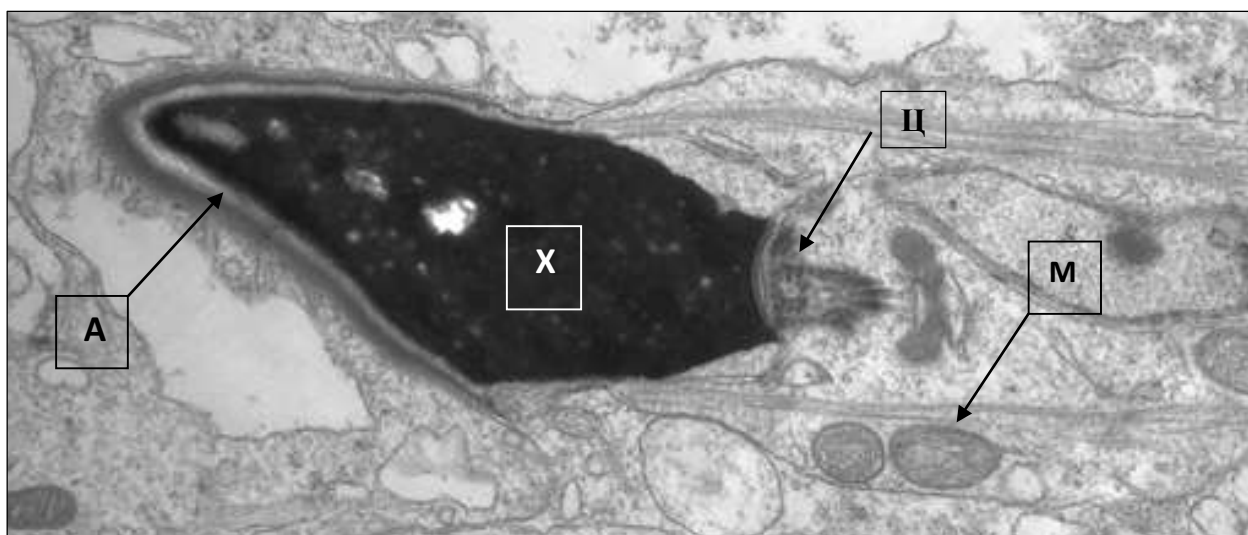


Рисунок 3.26 — Головка зрелой сперматиды с нормальной структурой хроматина (X). А – акросома, М – манжетка из микротрубочек, Ц – центриоль.

Преобладание сперматозоидов с вакуолизацией ядер и зрелым гомогенным хроматином отличало 36,4% мужчин с НОА и 27,5% представителей с другими типами азооспермии.

Неконденсированный гранулярный хроматин в ядрах сперматозоидов, встречается у мужчин и без нарушений фертильности, однако превышение содержания сперматозоидов с подобной морфологией свыше 30% может способствовать не только низкому качеству эмбрионов, но и спонтанному прерыванию беременности на ранних этапах постимплантационного развития. Наиболее часто «незрелый» хроматин с наличием гранулярно-фибриллярных нуклеопротеиновых комплексов диаметром около 40 нм в 30% и более головок зрелых сперматид, выявляли у мужчин с НОА (39,4%)($p < 0,001$), что статистически значимо больше, чем в остальных группах (12,5% при ОА и 25,0% - смешанной азооспермии). Аномалии структуры хроматина у части удлиненных сперматид, формы головок которых свидетельствуют о фазе зрелости, реализовались в недостаточной компактизации.

Сперматида с неконденсированным хроматином и фибриллами толщиной около 40 нм представлена на Рисунке 3.27.

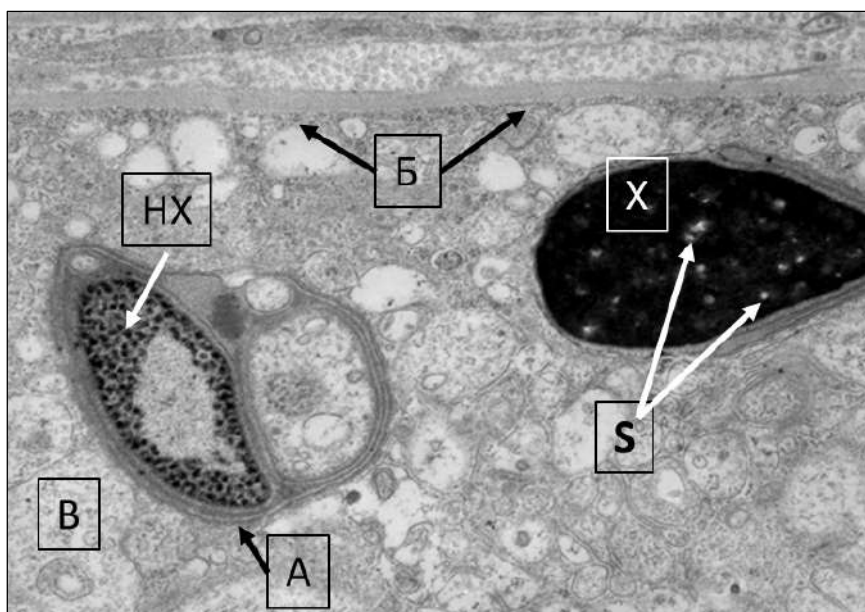


Рисунок 3.27 — Зрелые сперматиды с “незрелым” хроматином (НХ) и конденсированным хроматином (Х).

Незначительное количество сперматозоидов с нарушением компактизации хроматина и возрастанием его гранулярной фракции при переходе округлых сперматид в удлиненные (менее 30%) констатировали у 18,2% мужчин НОА и 30% – со смешанной азооспермией. Наименьший показатель отличал представителей с ОА (12,5%). Показатель сперматозоидов с нормальным положением акросомы отличал всех мужчин с ОА и 93,6% – смешанной азооспермией и НОА. Содержание головок сперматозоидов с акросомой атипичного строения, связываемое с нарушением их пенетрационной способности, составило 9,5% - при НОА и смешанной азооспермии. Сниженное количество интактных головок сперматозоидов – нормальной формы с нормальным строением хромосомы и акросомы (норма - 4%) отличало 16,7% представителей с ОА и НОА и вдвое реже встречалось при смешанной азооспермии (9,5%). Аномалии морфологии аксонемы и периаксонемных структур жгутиков сперматозоидов в исследуемой выборке мужчин с азооспермией выявлены не были.

Представителей остальных групп с азооспермией отличало наличие клеток всего сперматогенного ряда: зрелых сперматид с аморфной головкой, аксонемой и конденсированным хроматином, поляризованных сперматид на стадии формирования акросомы (Рисунок 3.28, 3.29, 3.30).

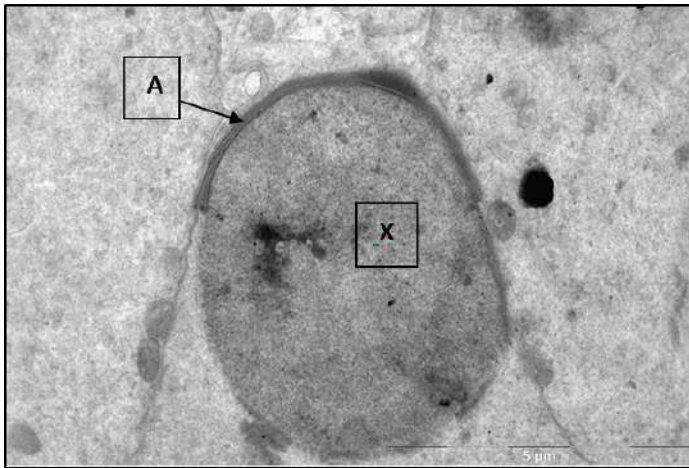


Рисунок 3.28 — Поляризованная сперматида. Акросомная стадия.
А – акросома, Х – диффузный хроматин

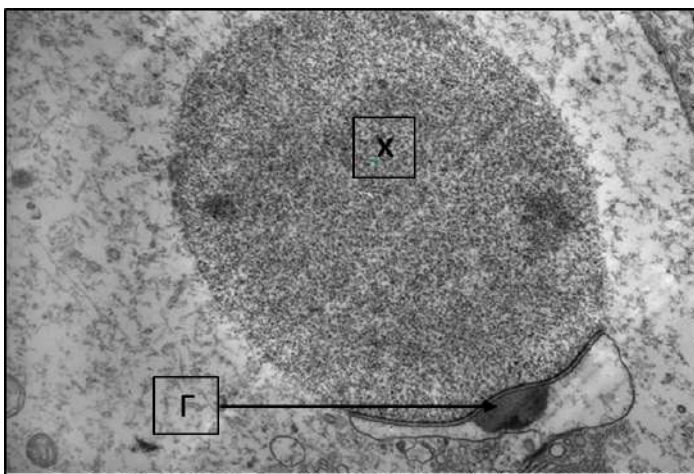


Рисунок 3.29 — Округлая сперматида на стадии шапочки.
Г – акросомная гранула, Х-хроматин

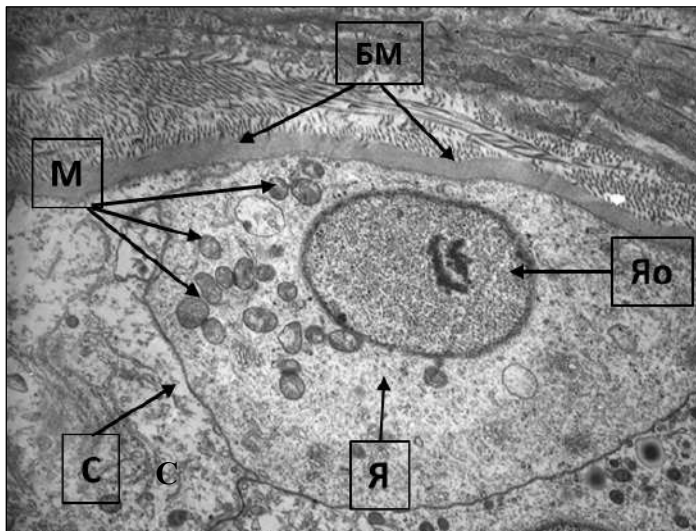


Рисунок 3.30 — Сперматогоний (С) около однослойной утолщенной базальной мембраны (БМ) извитого канальца. М–митохондрии, Я – ядро, Яо – ядрышко.

Выявлены сперматоциты, округлые и удлиненные сперматиды (Рисунок 3.31).

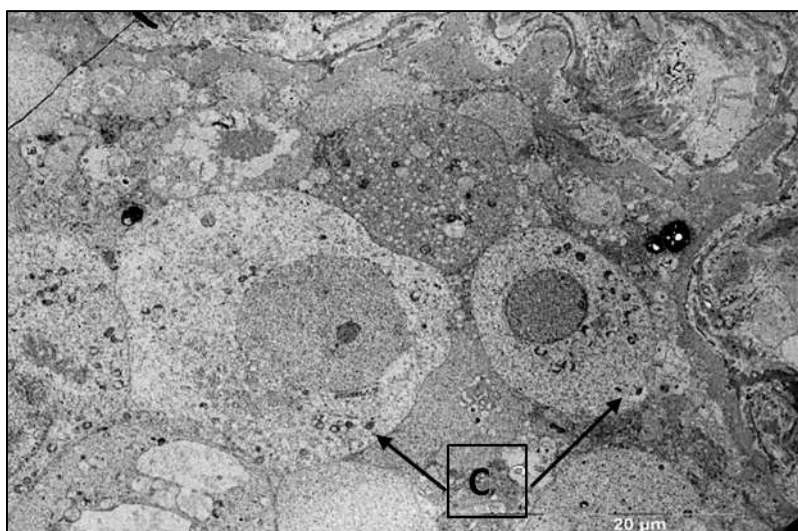


Рисунок 3.31 — Сперматоциты (С).

Показатель незрелых половых клеток оказался наибольшим при НОА (60,6%)($p=0,012$), тогда как при смешанной азооспермии их удельный вес составил 25,0%. Отсутствие зрелых фракций за счет блока сперматогенеза на разных стадиях развития половых клеток установлено у 27,3% мужчин с НОА в группе с СКС (Рисунок 3.32).

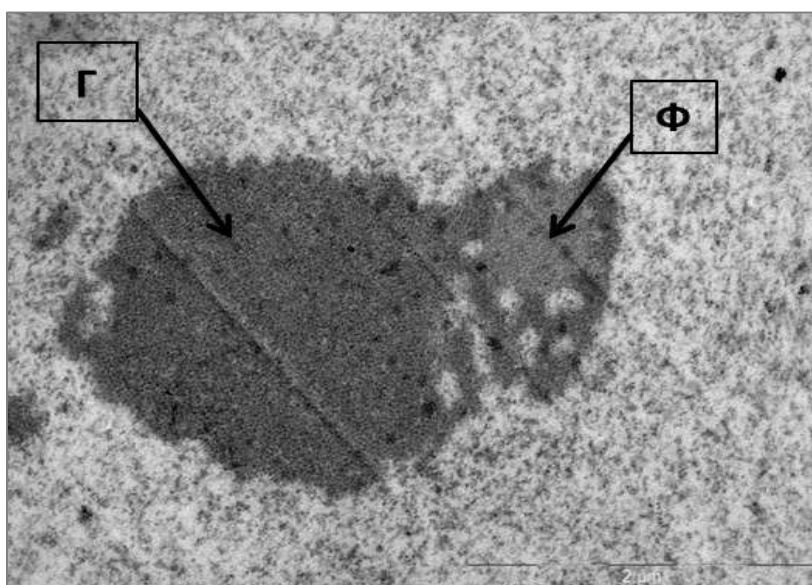


Рисунок 3.32— Ядрышко клетки Сертоли состоит из фибриллярного (Ф) и гранулярного (Г) компонентов.

Выявлены только клетки Сертоли с характерными двухфазными ядрышками, состоящими из гранулярного и фибриллярного компонентов (Рисунок 3.33).

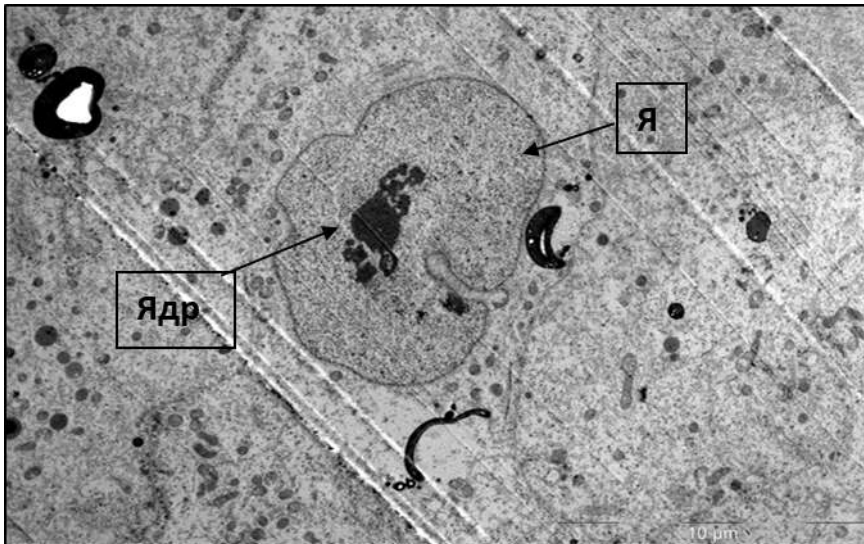


Рисунок 3.33— Клетка Сертоли. Я – ядро клетки Сертоли, Ядр – ядрышко.

Базальная мембрана – высокоспециализированная структура внеклеточного матрикса в зоне «стыка» плазматической мембраны клеток эпителия с соединительной тканью. Атипичное ее строение, формирование многослойной структуры и концентрических инвагинаций в цитоплазму прилежащих клеток семенного канальца выявлено у 72,7% представителей группы с НОА и практически вдвое реже – при смешанной азооспермии (25%, $p < 0,001$) (Рисунок 3.34).

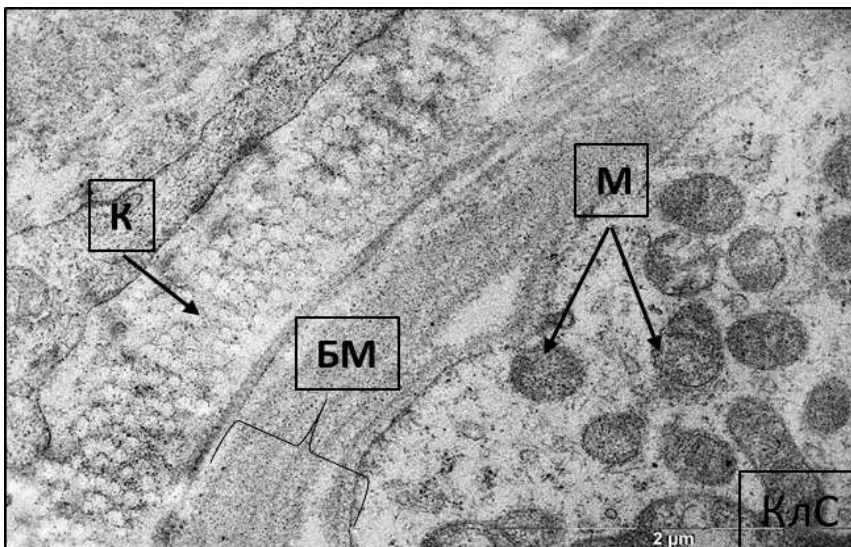


Рисунок 3.34 — Многослойная базальная мембрана (БМ). КлС – клетка Сертоли.

Фрагментарный характер многослойности БМ толщиной 0,1-0,15 мкм, неравномерность толщины ее отдельных участков, с расслоением и многочисленными инвагинациями в цитоплазму клеток Сертоли отмечали у четверти мужчин с ОА (26,1%) и 12% – смешанной азооспермией.

Истонченность однослойной БМ встречалась в единичных случаях при ОА (Рисунок 3.35).

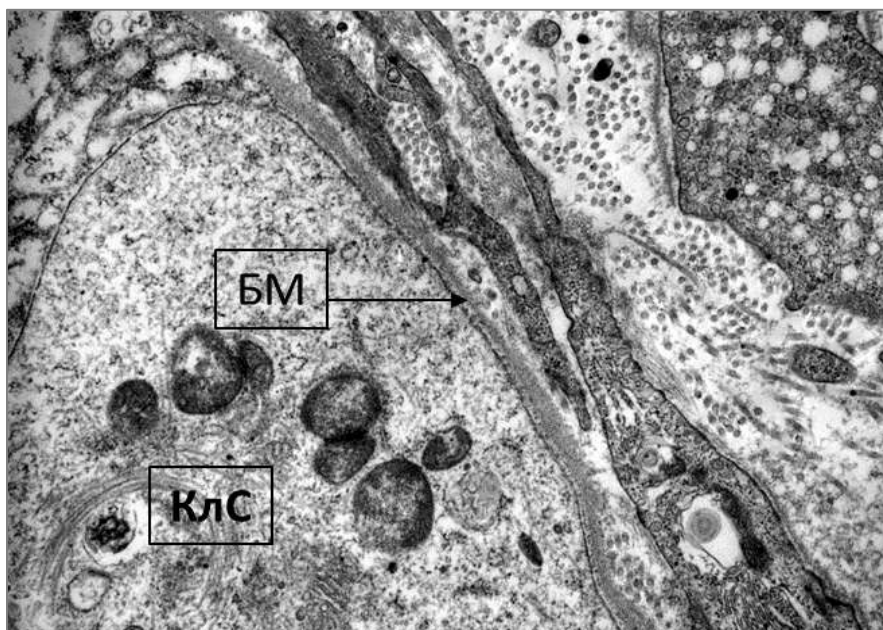


Рисунок 3.35 — Базальная мембрана (БМ) однослойная, местами истонченная. КлС – клетка Сертоли

Однослойная базальная мембрана оказалась свойственна 70,8% представителям с ОА ($p < 0,001$) и 45% – смешанной азооспермией ($p = 0,003$); утолщение ее стенки, нередко – неравномерное, с расслоением чаще встречалось при смешанной азооспермии (30,0%), в 18,2% – при НОА и только 4,2% – ОА (Рисунок 3.36).

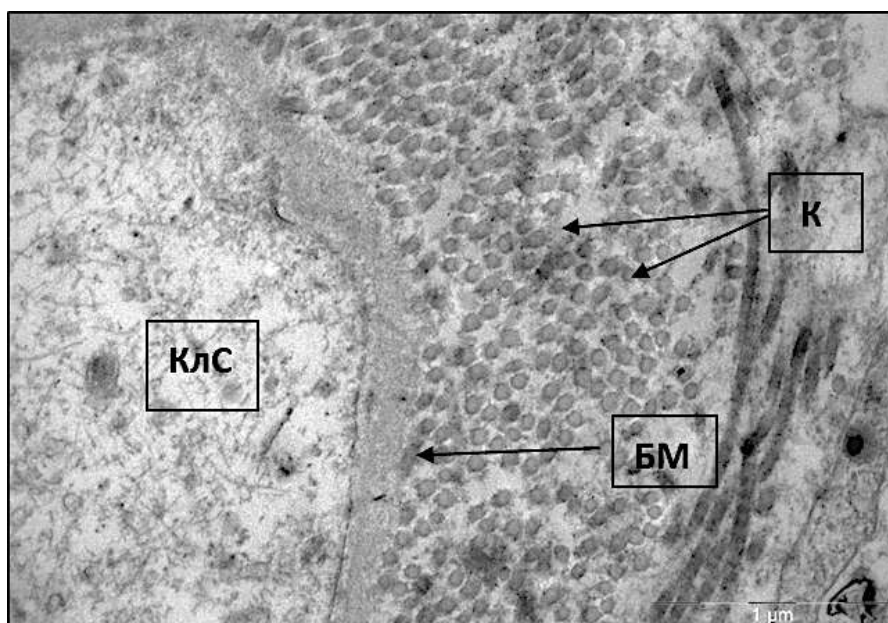
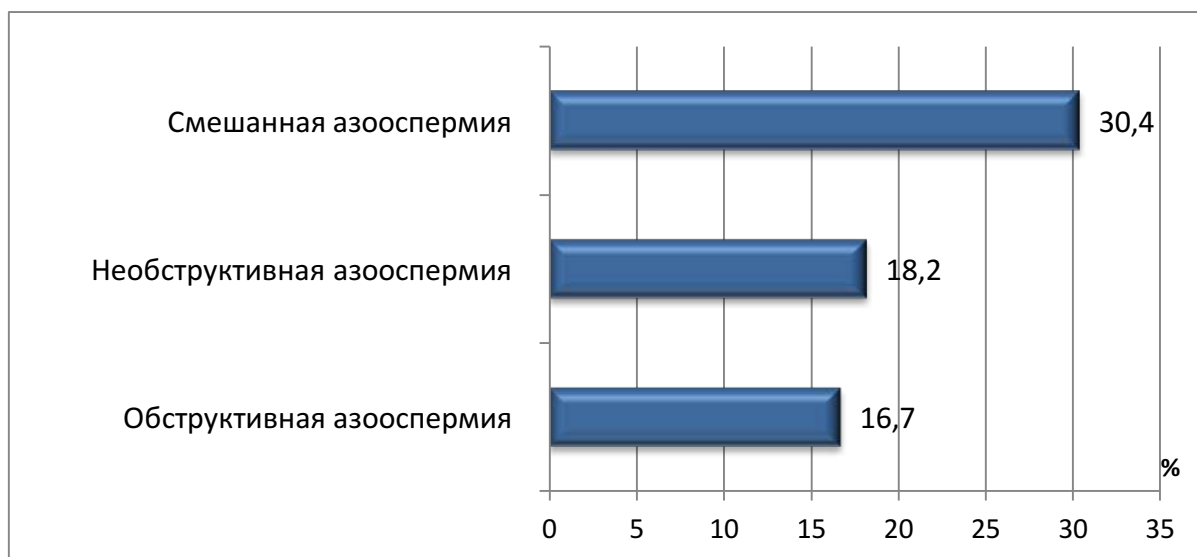


Рисунок 3.36 — Базальная мембрана однослойная, утолщенная (БМ), К – коллагеновые фибриллы, КлС – клетка Сертоли.

Степень бактериоспермии оказалась умеренно выраженной, без массивного обсеменения колониями инфектов, с наличием сегментоядерных нейтрофилов и ультраструктурными изменениями сперматозоидов: у 30,4% мужчин со смешанной азооспермией и 17,4% – с НОА и ОА (Рисунок 3.37).



$p > 0,05$

Рисунок 3.37 — Бактериальные микроколонии в эякуляте бесплодных мужчин с азооспермией при ЭМИС (n=77).

Нарушения дифференцировки при бактериоспермии чаще всего проявлялись образованием сперматозоидов с элементами деструкции – со сдвоенными головками, патологическими изменениями в структуре хроматина и акросомы.

Особенностью отдельных половых клеток, помимо «незрелости» хроматина, выступала проапоптотическая направленность с деградацией ядерного материала и накоплением большого количества липидных гранул (Рисунок 3.38, 3.39).

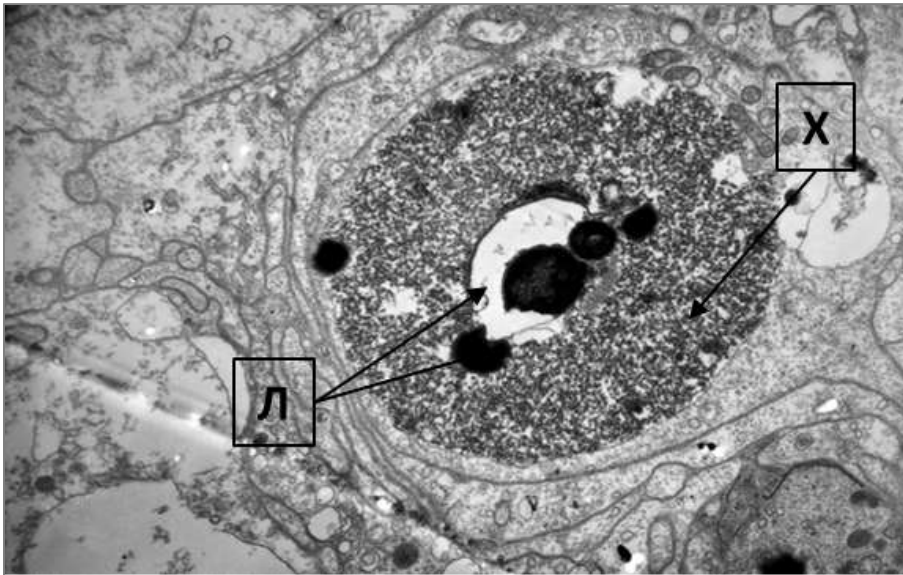


Рисунок 3.38 — Деградация ядерного материала половых клеток. Л - липидная деградация, Х - хроматин

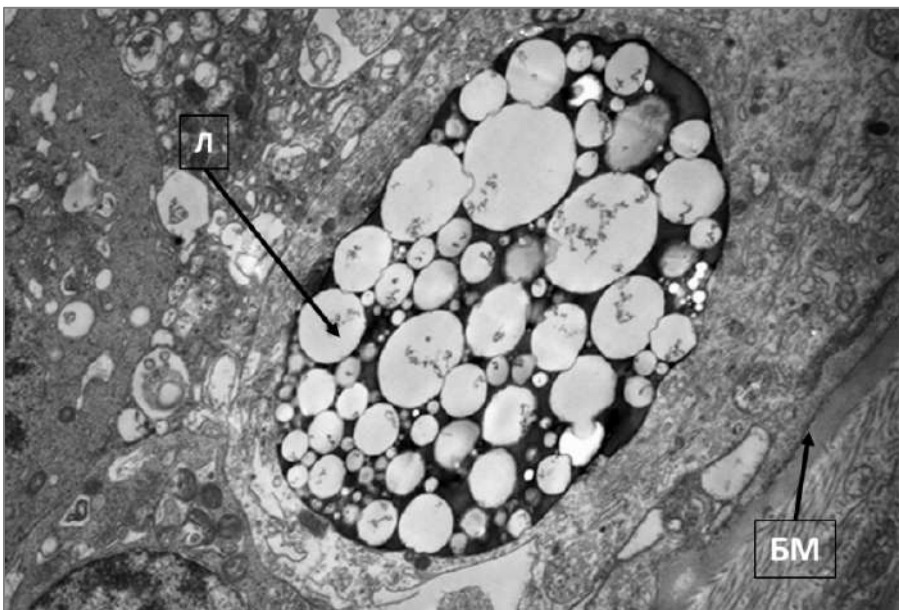


Рисунок 3.39— Липидная деградация (Л) ядерного материала половых клеток. БМ – утолщенная базальная мембрана.

В извитых канальцах отдельных образцов выявляли фибробластоподобные клетки, что свидетельствует о процессе фиброза.

Характеристики органоидов в зависимости от наличия мутантных генетических полиморфизмов представлены в Таблице 3.18.

Таблица 3.18 — Ультраструктурные особенности сперматозоидов мужчин с азооспермией и мутантными генетическими полиморфизмами

Группы		N	Нормальная форма ядра	Аномальная форма ядра	Зрелый хроматин	Зрелый вакуолизованный хроматин	Неконденсированный гранулярный хроматин <30%	Содержание сперматозоидов с недостаточно конденсированным	Нормальное положение акросомы	Аномальная морфология акросомы	Интактные головки нормальной формы с нормальным строением	Отсутствие зрелых клеток	Базальная мембрана многослойная	Базальная мембрана однослойная	Базальная мембрана утолщенная
AZFc	абс.	15	10	5	4	3	3*	8	6	9	2	0	12	0	0
	%		66,7	33,3	26,7	20,0	20,0	53,3	40,0	60,0	13,3	0	80,0	0	0
AZF b,c	абс.	5	0	0	0	0	0	0	3	2	1	4	5	0	0
	%		0	0	0	0	0	0	60,0	40,0	20,0	80,0	100,0	0	0
CFTR 5T/7T	абс.	2	2	0	1	1	2	2	1	1	0	0	0	0	2
	%		100,0	0	50,0	50,0	100,0	100,0	50,0	50,0	0	0	0,0	0	100,0
AZFc+ CFTR	абс.	12	6	6	3	3	0	6	9	3	1	0	6	0	0
	%		50,0	50,0	25,0	25,0	0,0	50,0	75,0	25,0	8,3	0	50,0	0	0
							*0,02								

Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с носительством *CFTR 5T/7T*, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Частота выявления неконденсированного гранулярного хроматина (НХ <30%) составила 100% при наличии в генотипе варианта *CFTR* 5T/7T ($p=0,02$). Многослойность БМ выступала отличительной характеристикой представителей с микроделециями AZF зоны Y-хромосомы (Рисунок 3.40).

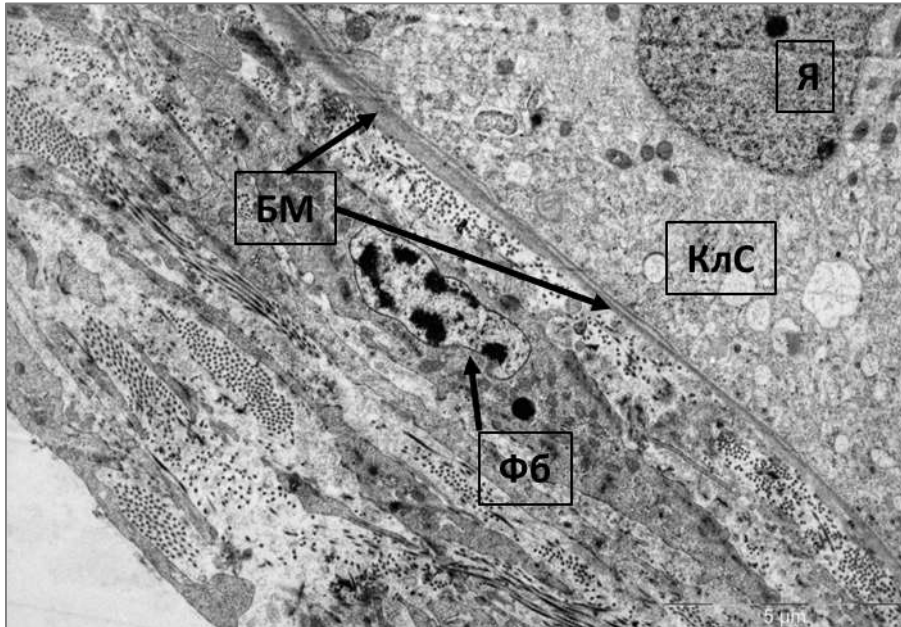


Рисунок 3.40 — Базальная мембрана (БМ) неравномерной толщины, местами с расслоением. КлС – клетка Сертоли, Фб – периканальцевый фибробласт, Я – ядро клетки Сертоли.

3.7. Результаты цитогенетического исследования синаптонемных комплексов

Анализ СинК сперматоцитов I порядка показал, что нарушение формирования структуры полового тельца в мейозе, в норме связанного с инактивацией X хромосомы, имело место у 25% мужчин с ОА (Рисунок 3.41).



$p > 0,05$

Рисунок 3.41 — Варианты нарушений СинК при цитогенетическом исследовании (n=77).

Нарушение формирования структуры полового тельца с развитием его незрелых форм выступает морфологическим признаком «пахитенного ареста», вероятно, – детерминирующего нарушение фертильности у представителей с ОА на генетическом уровне.

На Рисунке 3.42 представлен сперматоцит на стадии пахитены первого деления мейоза.

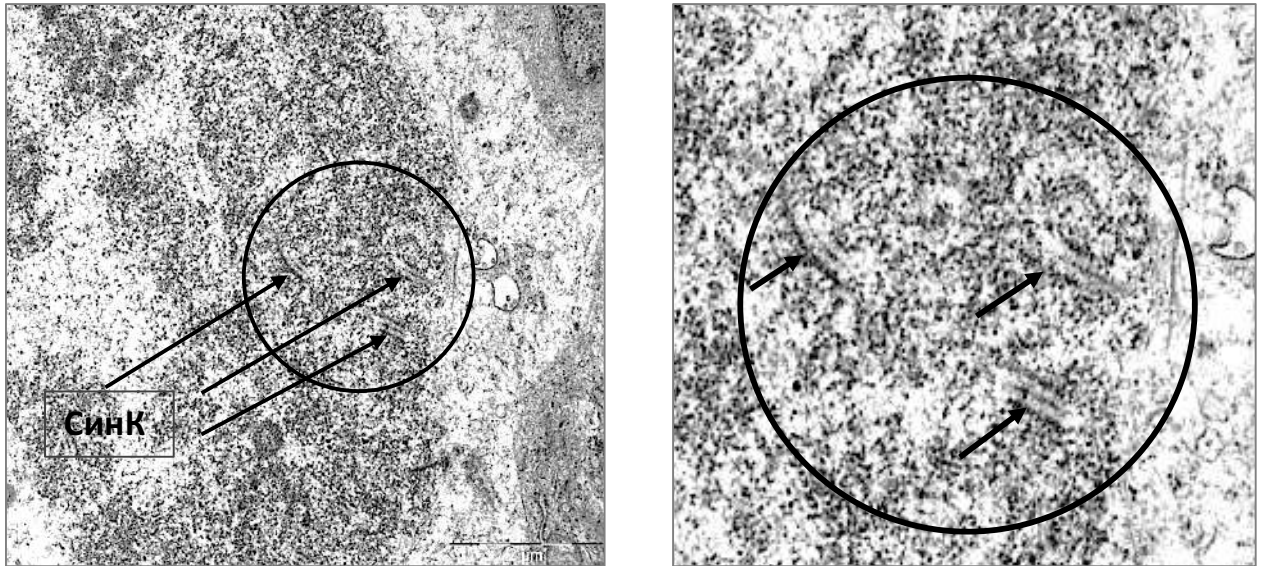


Рисунок 3.42 — Сперматоцит на стадии пахитены. Видны фрагменты синаптонемного комплекса (СинК).

Выявленное большое количество пахитенных сперматоцитов (Рисунок 3.43) свидетельствовало о блоке мейоза на одноименной стадии.

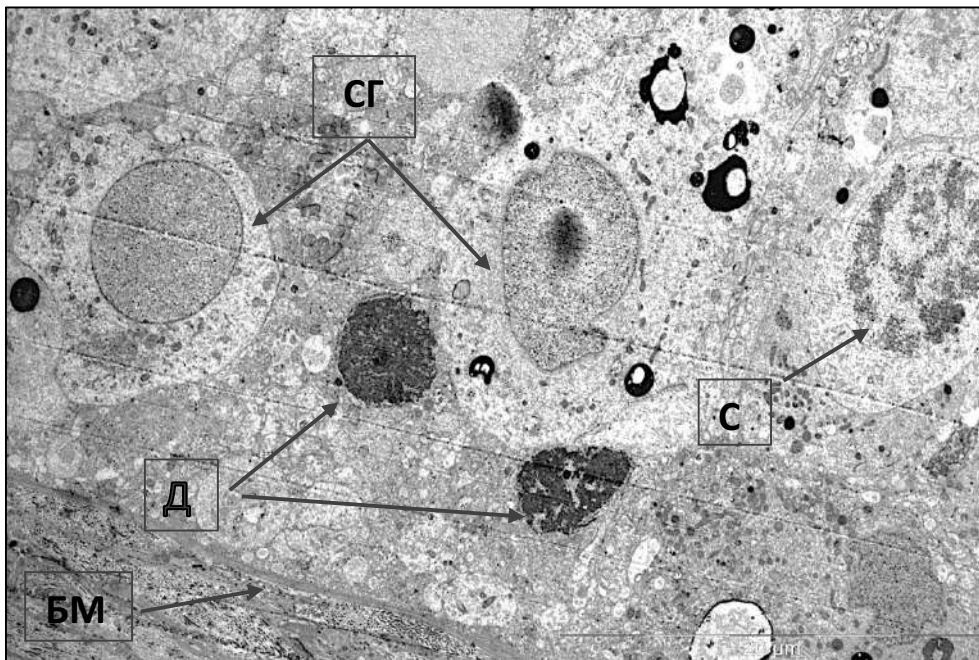


Рисунок 3.43 — Пахитенные сперматоциты (С), сперматогонии (СГ), округлые и удлиненные сперматиды с дегенерацией ядер (Д). БМ – базальная мембрана.

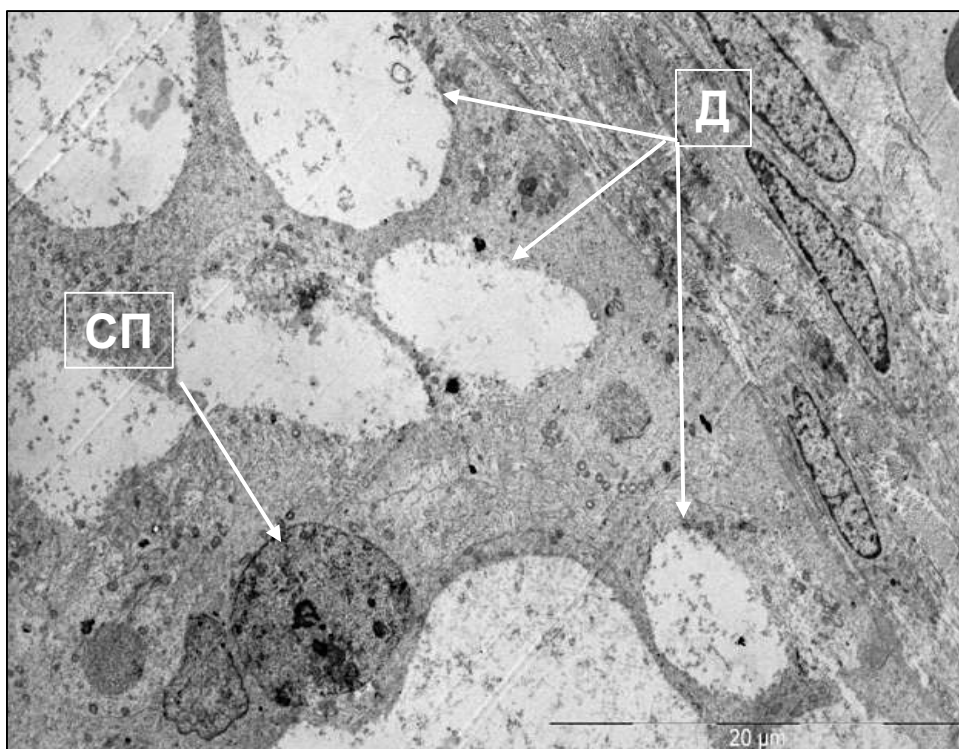


Рисунок 3.44 — Пахитенный сперматоцит (СП). В ткани семенного канальца яичка видны многочисленные пространства на месте дегенерирующих клеток (Д).

Блок сперматогенеза на стадии пахитены профазы I мейоза путём «заякоривания» бивалентов наиболее часто фигурировал по результатам цитогенетического исследования СинК сперматоцитов представителей с азооспермией (54,8% в среднем). Морфоструктурной основой «пахитенного ареста» второго типа выступала ассоциация полового бивалента с аутосомой и его локализация среди аутосом. Нормальное течение мейоза предполагает «выселение» плотно укутанного белками полового бивалента к стадии средней пахитены на периферию ядра сперматоцита. Наблюдаемые нарушения гомологии аутосом и синапсиса между ними приводили к их ассоциации с XY бивалентом. Частым проявлением мейотических нарушений у пациентов с азооспермией является выраженная в разной степени фрагментация хромосом. В части пахитенных ядер определяли единичные их фрагменты наряду с атипичной архитектоникой ядра и извитой формой СинК (15,2%).

Выраженная фрагментация хромосом и мейотическая катастрофа оказались типичными для 40% мужчин со смешанной азооспермией и

четверти – ОА. Отсутствие пахитенного ареста способствует дальнейшей дифференцировке незрелых половых клеток, исходом которой становится риск попадания в созревающие сперматозоиды фрагментированных хромосом. Хроматин фрагментов хромосом не подвергается транскрипционному сайленсингу, отсутствует ассоциация фрагментированных обломков хромосом с половым бивалентом. Такие нарушения в ядрах незрелых половых клеток потенциально несут риск делеций, формирования сложных перестроек хромосом или кольцевых хромосом в потомстве.

Констатации блоков сперматогенеза на стадии зиготены-лептотены – при НОА с равной частотой способствовало выявление при цитогенетическом анализе повышенного количества незрелых половых клеток с признаками дегенерации при наличии единичных зрелых сперматид (тестикулярных сперматозоидов) (Рисунок 3.45 а, б).

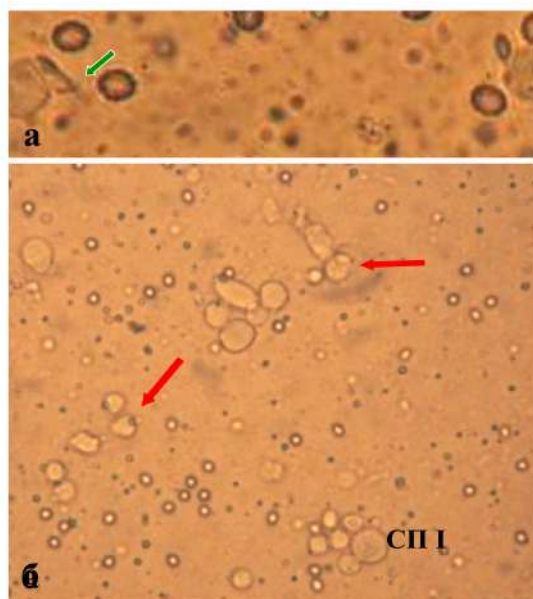


Рисунок 3.45 — Суспензия тестикулярных клеток биоптата: фазовый контраст.
 а. Зеленая стрелка указывает на тестикулярный сперматозоид.
 б. СП I - крупный сперматоцит I порядка. Видны атипичные мелкие сперматоциты I порядка (красные стрелки)

Соотношение состояния ГТ-ГФ-гонадной системы с результатами цитогенетического исследования гамет показало: нормогонадотропный гипогонадизм при ОА встречался у всех мужчин с мейотической катастрофой, половины – с нарушением формирования полового тельца, смешанной азооспермии – у четверти с фрагментацией СинК. Подобный гормональный статус встречался при всех типах азооспермии, у мужчин с блоком мейоза на стадии пахитены: 66,7% со смешанной азооспермией, 22,2% – НОА и трети – ОА ($p=0,008$) (Таблица 3.19).

Вариант неизменной функции яичек отличал всех мужчин с НОА и блоком мейоза на стадии лептотены, 75% – со смешанной азооспермией и фрагментацией СинК; среди представителей с блоком мейоза на стадии пахитены – 66,7% с ОА и треть – смешанной азооспермией.

Таблица 3.19 — Варианты нарушений структуры СинК в зависимости от состояния эндокринного статуса

Группы		N	Нормогонадотропный гипогонадизм	Нормогонадотропное состояние. Нормальная функция	Гипогонадотропный гипогонадизм	Гипергонадотропное по ЛГ состояние. Нормальная функция яичек	Гипергонадотропное по ФСГ состояние, Нормальная функция яичек
Азооспермия обструктивная	Мейотическая катастрофа	абс.	6	6	0	0	0
		%		100,0	0,0	0,0	0,0
	Нарушение формирования полового тельца	абс.	6	3*	0	3	0
		%		50,0	0,0	50,0	0,0
	Блок мейоза на стадии пахитены	абс.	12	4*	8	0	0
		%		33,3	66,7	0,0	0,0
Азооспермия необструктивная	Блок на стадии зиготены	абс.	5	0	0	0	5
		%		0,0	0,0	0,0	100,0
	Блок на стадии лептотены	абс.	5	0	5	0	0
		%		0,0	100,0	0,0	0,0
	Блок на стадии пахитены	абс.	18	4	0	3**	7
		%		22,2	0,0	16,7	38,9
	Атипичная архитектура ядра	абс.	5	0	0	5	0
		%		0,0	0,0	100,0	0,0
Азооспермия смешанная	Блок на стадии пахитены	абс.	12	8	4	0	0
		%		66,7	33,3	0,0	0,0
	Фрагментация СинК	абс.	8	2	6	0	0
		%		25,0	75,0	0,0	0,0
				*0,046 *0,008			
					**<0,001		

Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость внутригрупповых отличий от «Мейотическая катастрофа» при ОА, ** – от «Атипичная архитектура ядра» при НОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

«Гипергонадотропное по ЛГ состояние, нормальная функция яичек» оказалось свойственно всем представителям с НОА, имеющим блок мейоза на стадии зиготены и 38,9% – пахитены, «по ФСГ» – 22,2% – с «пахитенным арестом». Превалирование сперматоцитов I порядка на стадии лептотены-ранней зиготены объясняет остановку их дифференцировки (Рисунок 3.46 а), однако в 5% клеток выявлено завершение синапсиса хромосом и, следовательно, продвижение на стадию ранней пахитены (Рисунок 3.46 б).

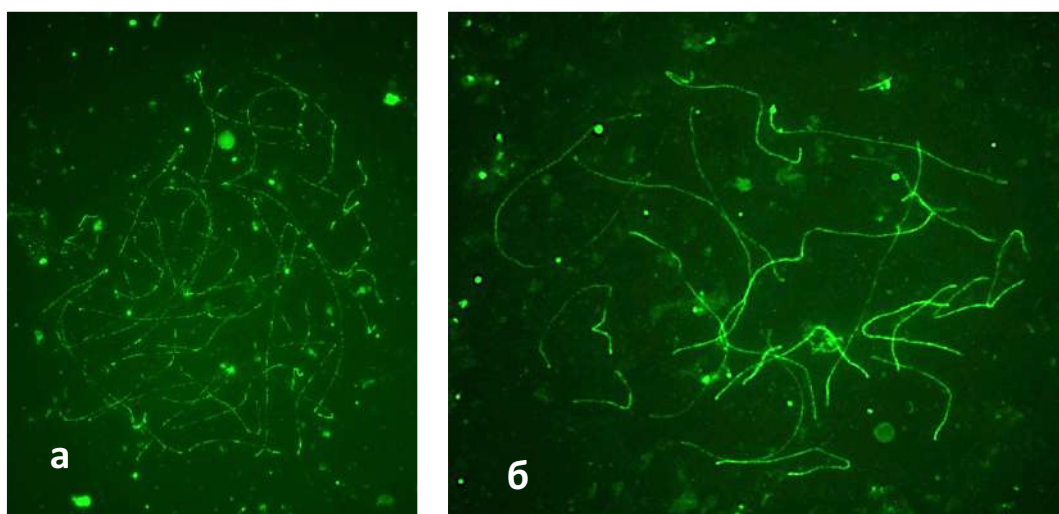


Рисунок 3.46 — Распластанные ядра сперматоцитов I порядка. а) - стадия зиготены. б) - стадия ранней пахитены. Синапсис аутосом завершен. Осевые элементы хромосом и СинК иммуноокрашены антителами к белку SCP3 (зеленый)

Выявление единичных тестикулярных сперматозоидов указало на фокальную активность сперматогенеза.

Констатация при смешанной азооспермии по результатам ИЦХ образцов с ядрами сперматоцитов (2%) на стадии поздней пахитены с 22 полностью синаптированными аутосомными бивалентами и половым бивалентом, выселенным на периферию ядра (XY бивалент формирует типичное половое тельце (XY)) (Рисунок 3.47).

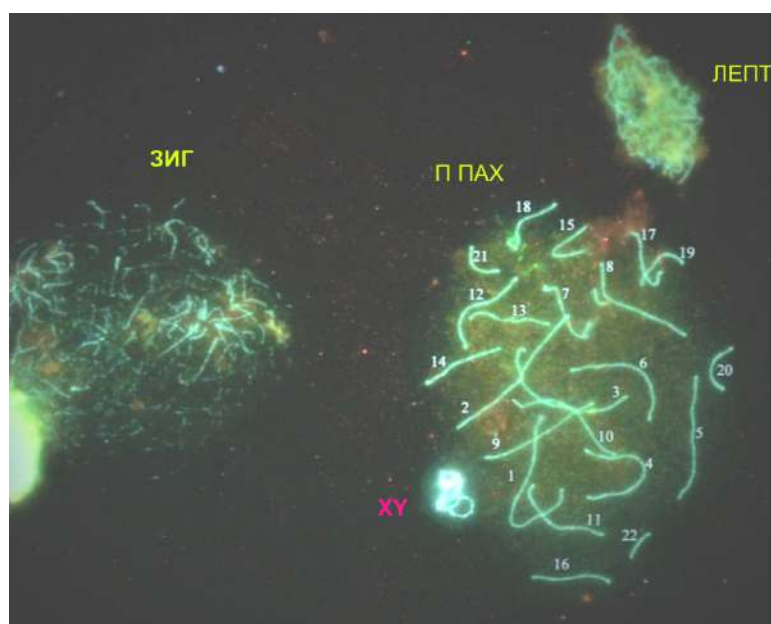


Рисунок 3.47— Распластанные ядра сперматоцитов на стадиях лептотены (ЛЕПТ), зиготены (ЗИГ) и поздней пахитены (П ПАХ).

В ядре на стадии поздней пахитены видны полностью синапированных 22 аутомных бивалента и половой бивалент, выделенный на периферию ядра (XY). В верхнем правом углу видно ядро сперматоцита на стадии лептотены. Осевые элементы хромосом СинК иммуноокрашен антителами к белку SCP3 (зеленый).

В 14% сперматоцитов I порядка с нарушениями синапсиса хромосом и арестом мейоза на стадии средней пахитены в одном из 17 ядер обнаружена кольцевая хромосома (Рисунок 3.48).

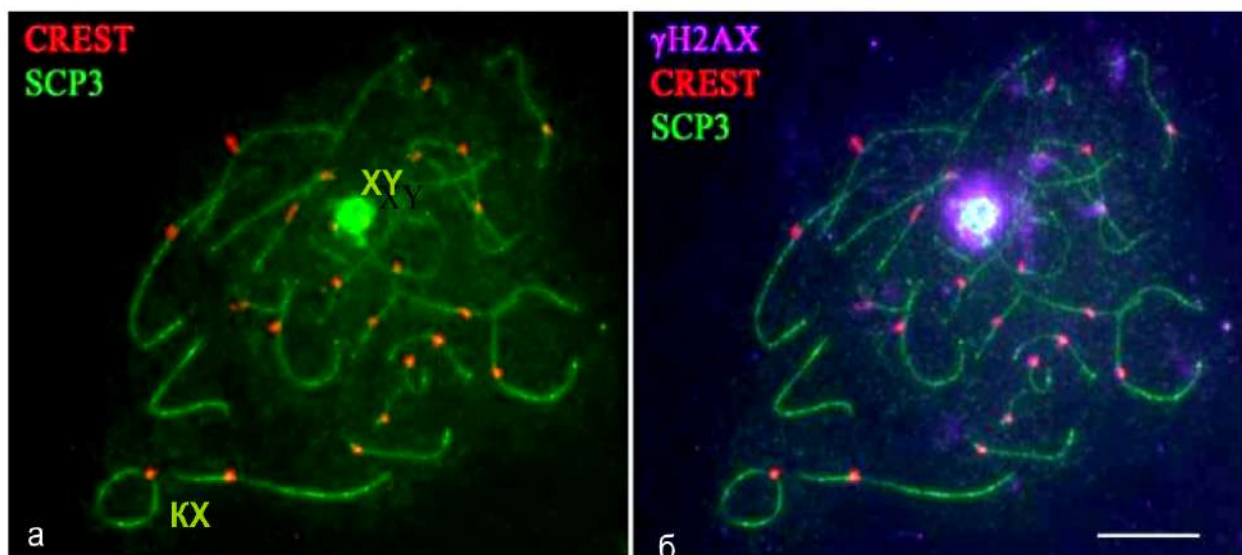


Рисунок 3.48 — Сперматоцит I порядка с типичными признаками пахитенного ареста - расположением полового (XY) бивалента в центре ядра, ассоциацией его с аутомной с нарушением синапсиса и репарации DSBs. KX - кольцевая хромосома.

Вероятность выявления при смешанной азооспермии фрагментации СинК превалировала при нормогонадотропном состоянии, не исключая возможности выявления единичных сперматозоидов (Рисунок 3.49).

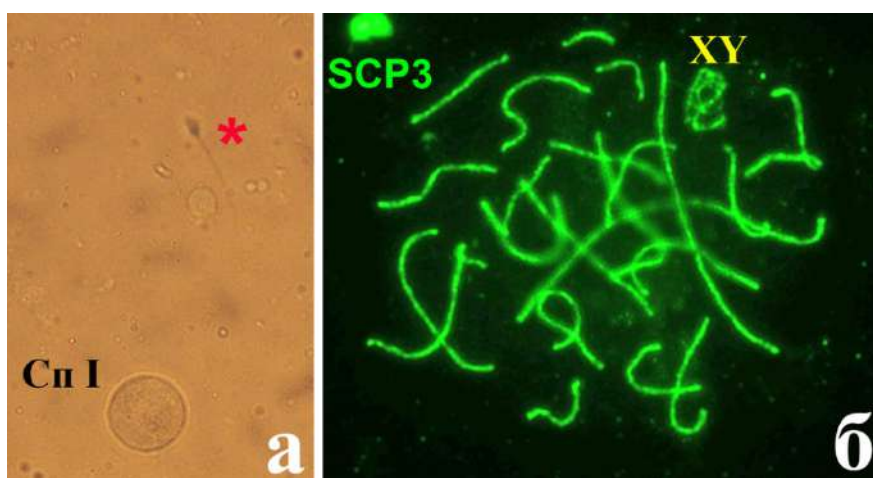


Рисунок 3.49 — а - Суспензия тестикулярных клеток. Сп I - сперматоцит I порядка. Звездочкой отмечен тестикулярный сперматозоид. б. Распластанное на стадии поздней пахитены ядро сперматоцита I порядка. XY - половое тельце выселено на периферию ядра. Видны 22 аутосомных СинК.

Однако нормальные ядра со сформированным СинК и половым тельцем составляли 10% в выборке. Характерной особенностью «дефектных» ядер сперматоцитов оказалось различие их площади (на стадии профазы I мейоза) и длины СинК. Архитектоника таких «крупных ядер» была нарушена за счет разрывов СинК (Рисунок 3.50 а и б).

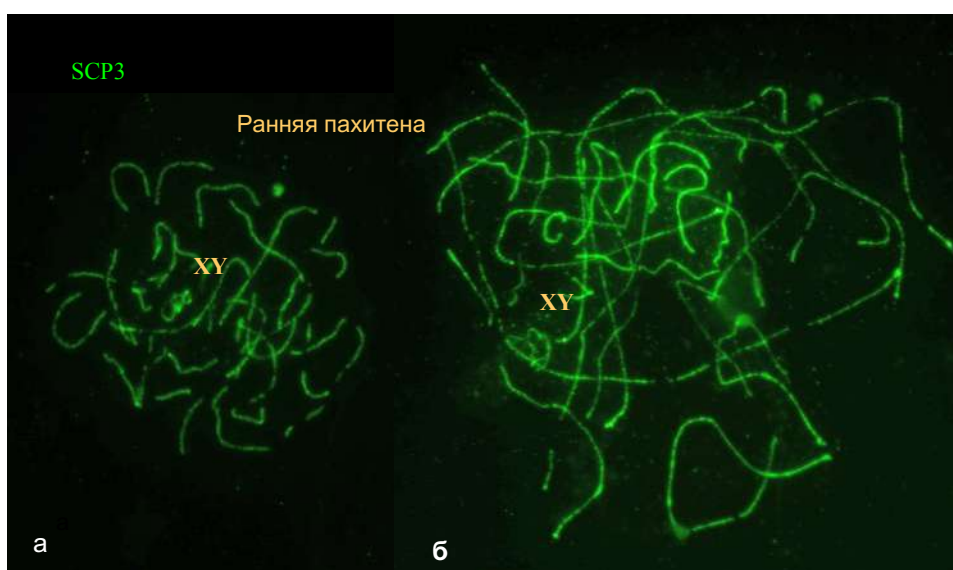


Рисунок 3.50 — а, б. Расплащенные на стадии ранней пахитены ядра двух сперматоцитов

Вариант «пахитенного ареста» в 18 из 24 распластанных ядер сперматоцитов I порядка с нарушением образования структуры полового тельца (всего на стадии средней-поздней пахитены 20 клеток)(Рисунок 3.51 б) сочетался с фрагментированным во всех исследованных ядрах СинК (Рисунок 3.51 а и б). Половое тельце было сформировано в двух ядрах.

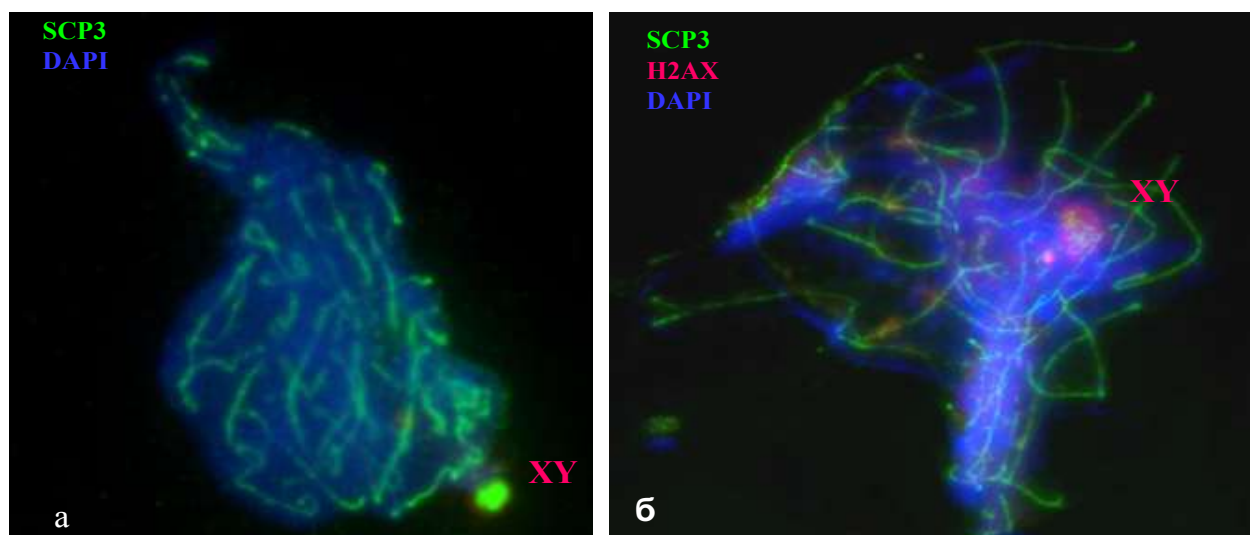


Рисунок 3.51 — Распластанные ядра сперматоцитов I порядка Стадия поздней пахитены. а - половой бивалент XY формирует половое тельце. б - нарушение формирования структуры полового тельца; фрагменты СинК видны в обоих ядрах.

Гипогонадотропный гипогонадизм чаще констатировали при НОА: у 16,7% мужчин с блоком мейоза на стадии пахитены и всех – с атипичной архитектоникой ядра ($p < 0,001$), ОА – половины с нарушением формирования структуры полового тельца.

Особенности суспензий клеток тестикулярной ткани: наличие сперматоцитов I порядка и тестикулярных сперматозоидов (зрелых сперматид).

По результатам исследования СинК: выявлена вариабельность блока сперматогенеза – от стадии зиготены (Рисунок 3.52 а, б) до поздней пахитены-диплотены с завершенным синапсисом хромосом и сформированным половым тельцем (Рисунок 3.52 в).

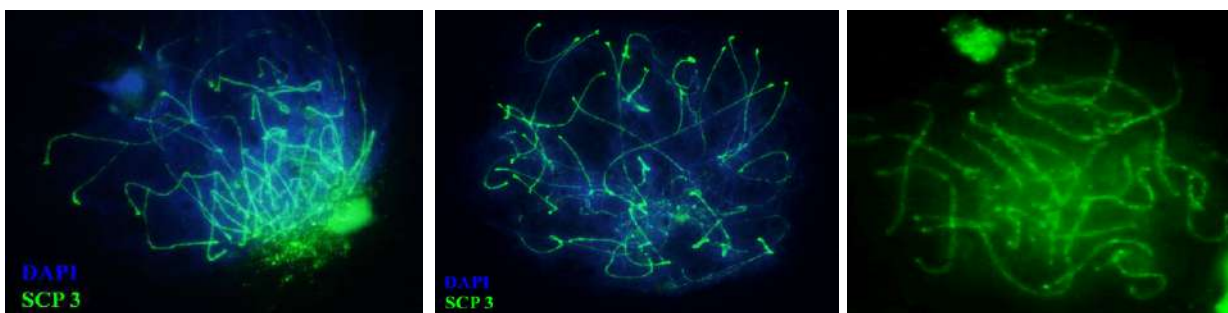


Рисунок 3.52 — (а-в). Распластанные ядра сперматоцитов I порядка.

а). Типичная картина "букета", обеспечивающая сближение гомологов на стадии ранней зиготены, б). Стадия поздней зиготены. Видны частично асинапированные осевые элементы хромосом, в). Слева ядро на стадии пахитены, справа - ранней диплотены. Половой бивалент формирует типичное половое тельце (XY). Хроматин окрашен красителем Dapi (синий). СинК иммуноокрашены антителами к белку SCP3 (зеленый).

Распределение по группам осуществлялось по доминантному признаку: атипичные клетки с нарушением архитектоники ядер СинК и его разрывами. Признаки «пахитенного ареста» обнаруживали в 30-50% сперматоцитов. При смешанной азооспермии у 25% пациентов с нормогонадотропным гипогонадизмом и 75,0% – нормогонадотропным состоянием порядка в 90% клеток наблюдали тотальную фрагментацию СинК и осевых элементов хромосом – признак селекции на стадии зиготены – пахитены (Рисунок 3.53 а). Завершение синапсиса хромосом в 10% клеток полностью (Рисунок 3.53 б) не исключало признаков пахитенного ареста и формирование петель в структуре СинК – у двух третей с нормогонадотропным гипогонадизмом и трети – нормогонадотропным состоянием.

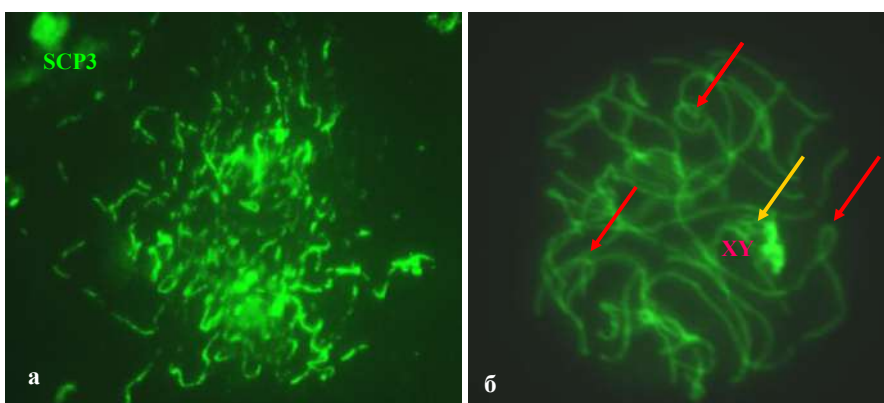


Рисунок 3.53 — Распластанные ядра сперматоцитов I порядка.

а. Тотальная фрагментация осевых элементов и СинК.
б. Стадия поздней пахитены. Ассоциация полового (XY) бивалента с аутосомами (желтая стрелка). Красные стрелки указывают на петли в структуре аутосомных СинК.

Внутригрупповые особенности при смешанной азооспермии – при дегенерации более чем половины сперматоцитов одновременно с фрагментацией структуры СинК выявляли полную хромосомную «пульверизацию» (Рисунок 3.54 а). В части СинК определяли атипичные петли (Рисунок 3.54 б), в ядрах без его фрагментов – признаки ареста мейоза на стадии средней-поздней пахитены – ассоциация полового бивалента, с аутосомами (Рисунок 3.54 в).

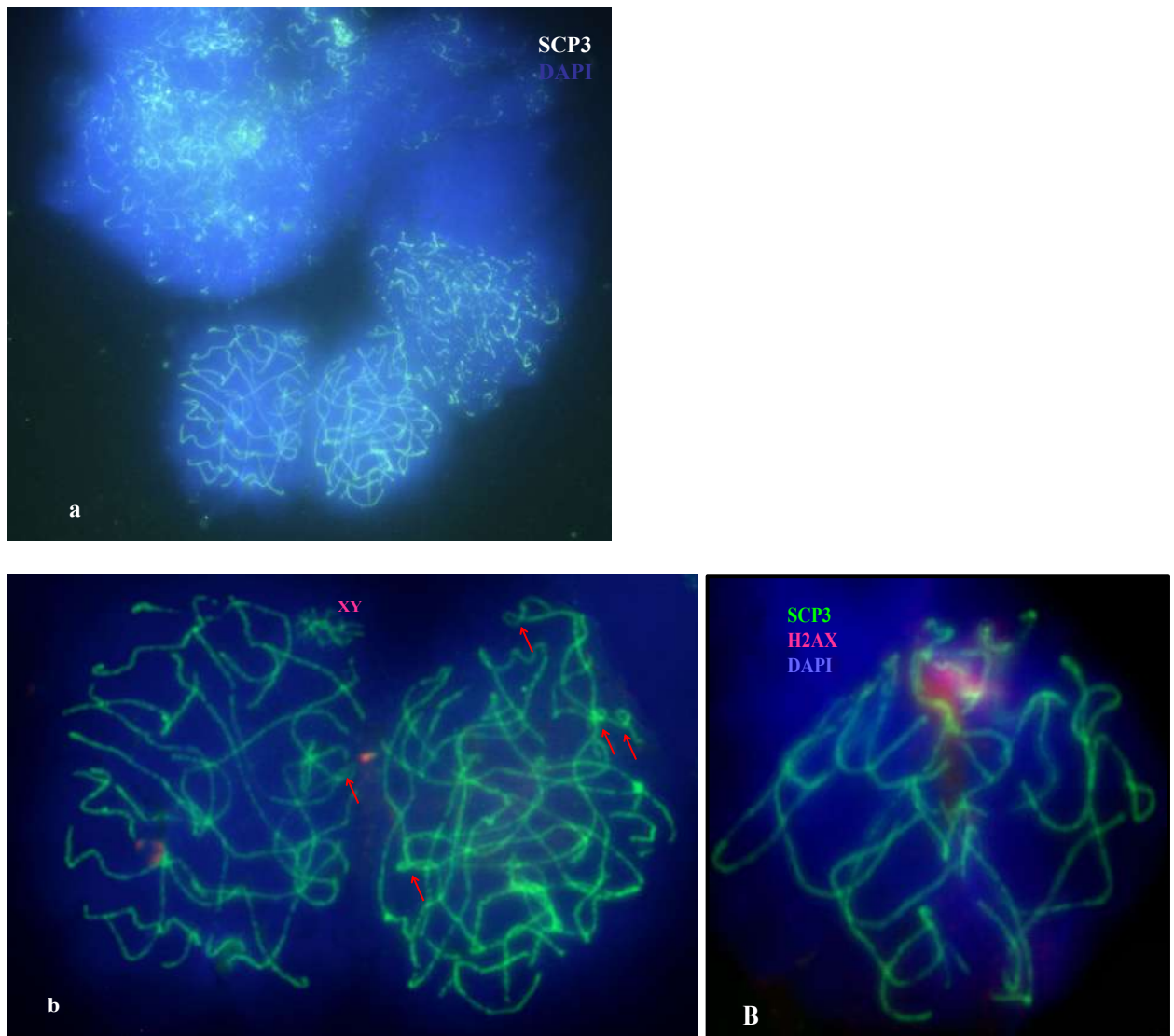


Рисунок 3.54 — Распластанные ядра сперматоцитов I порядка.

а. Обзорная фотография. Видна дегенерация трех клеток из 5, в которых выявляют СинК или его фрагменты и осевые элементы, вплоть до тотальной «пульверизации».

б. Атипичные петли в структуре СинК (красные стрелки).

в. Арест на стадии средней-поздней пахитены. Ассоциация полового бивалента, иммуноокрашенным антителами к гистону гамма H2AX, с аутосомами.

В распластанных ядрах пахитенных сперматоцитов выявлены атипичные утолщения и волнистость СинК (Рисунок 3.55 а, б). «Пулверизация» СинК происходит после завершения синапсиса хромосом (Рисунок 3.55 в, г), перехода клеток на стадию пахитены.

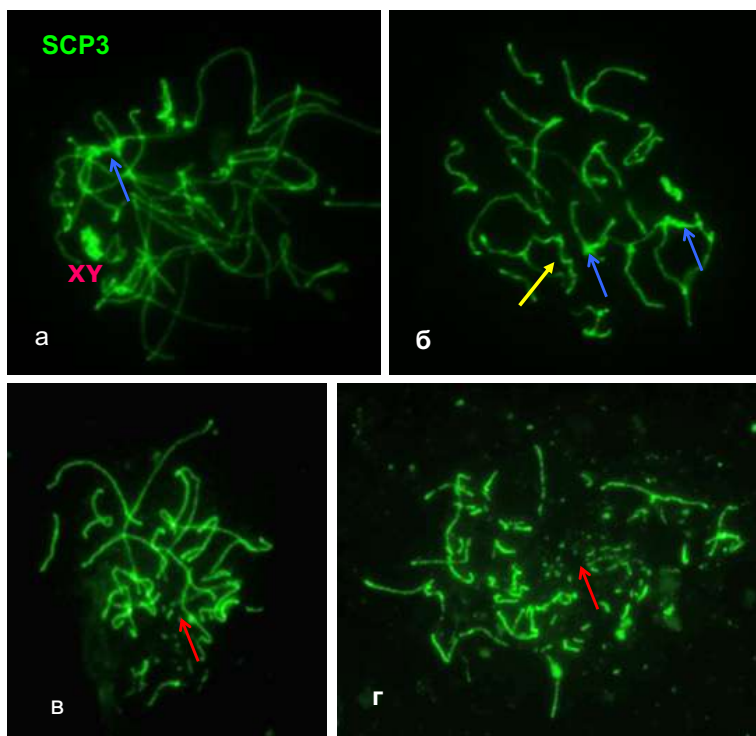


Рисунок 3.55 — Распластанные ядра сперматоцитов I порядка.

а. Стадия средней пахитены. ХУ - половой бивалент. Синяя стрелка указывает на атипичные утолщения СинК; б. Стадия средней пахитены, видна атипичная складчатость СинК (желтая стрелка) и утолщения СинК (синие стрелки); в, г. Участки пулверизации СинК в ядрах сперматоцитов.

При смешанной азооспермии в группе с нормогонадотропным гипогонадизмом различие в объеме фрагментации СинК определяло комбинацию частичного и тотального вариантов (Рисунок 3.56 а,б).

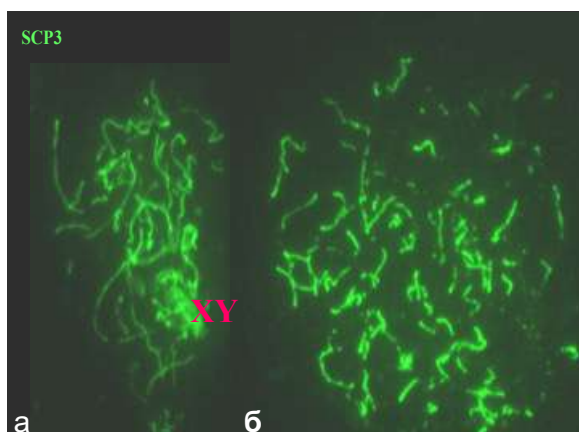
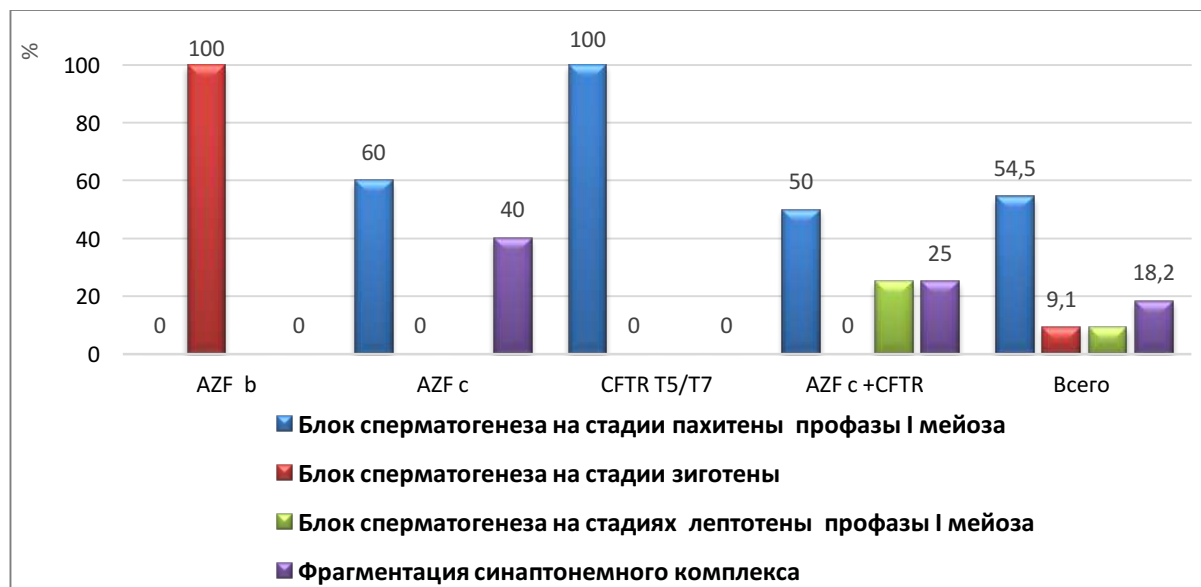


Рисунок 3.56 — Распластанные ядра сперматоцитов I порядка с частичной (а) и полной фрагментацией СинК (б).

В отдельных ядрах прослеживалась ассоциация ауросом с половым (XY) бивалентом (Рисунок 3.56 а).

Состояние СинК разительно отличалось в зависимости от типов AZF-делеций (Рисунок 3.57).



$p > 0,05$

Рисунок 3.57 — Характеристики СинК в зависимости от наличия и особенностей генетических полиморфизмов (n=77).

Носительство микроделеций локуса AZFb Y хромосомы сопровождалось признаками мейотической катастрофы, при которой селекция сперматоцитов выражалась в распаде всех хромосом на более мелкие фрагменты у 60% мужчин. Остальных представителей с AZFb-делециями (40%) отличал блок мейоза на стадии зиготены. При анализе СинК у пациента с микроделецией AZFb+c обнаружены единичные ядра на стадии профазы I мейоза с тотальным нарушением синапсиса хромосом.

У пациентов с азооспермией наличие полных AZF делеций, в частности, типа AZFb и AZFb+c выступало маркером выраженного угнетения сперматогенеза: полной остановки на стадии сперматогониев и невозможности получения сперматозоидов, пригодных для искусственного оплодотворения.

При анализе суспензии клеток яичка пациента с НОА и полной делецией двух регионов локуса AZFb+c Y хромосомы выявлены лишь

единичные сперматоциты I порядка. В процессе получения препаратов распластанных ядер сперматоцитов обнаружено всего 8 клеток, 7 из которых - на стадии лептотены, одна - зиготены. Клетки на стадии пахитены не обнаружены (Рисунок 3.58).

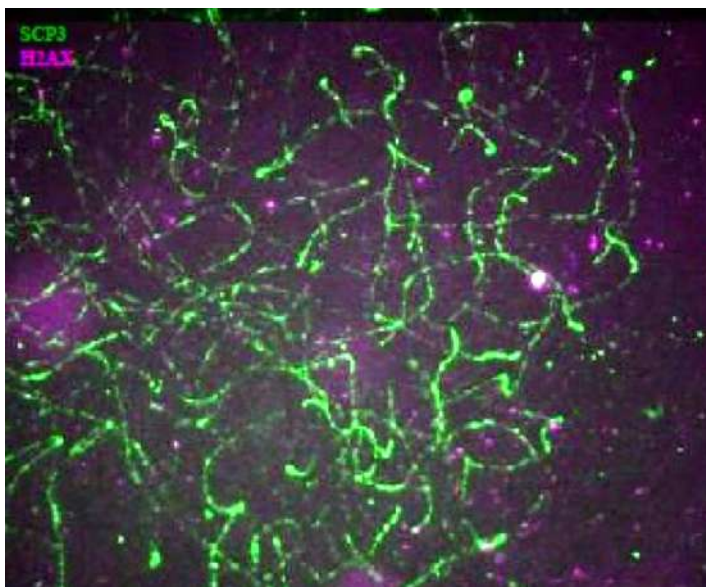
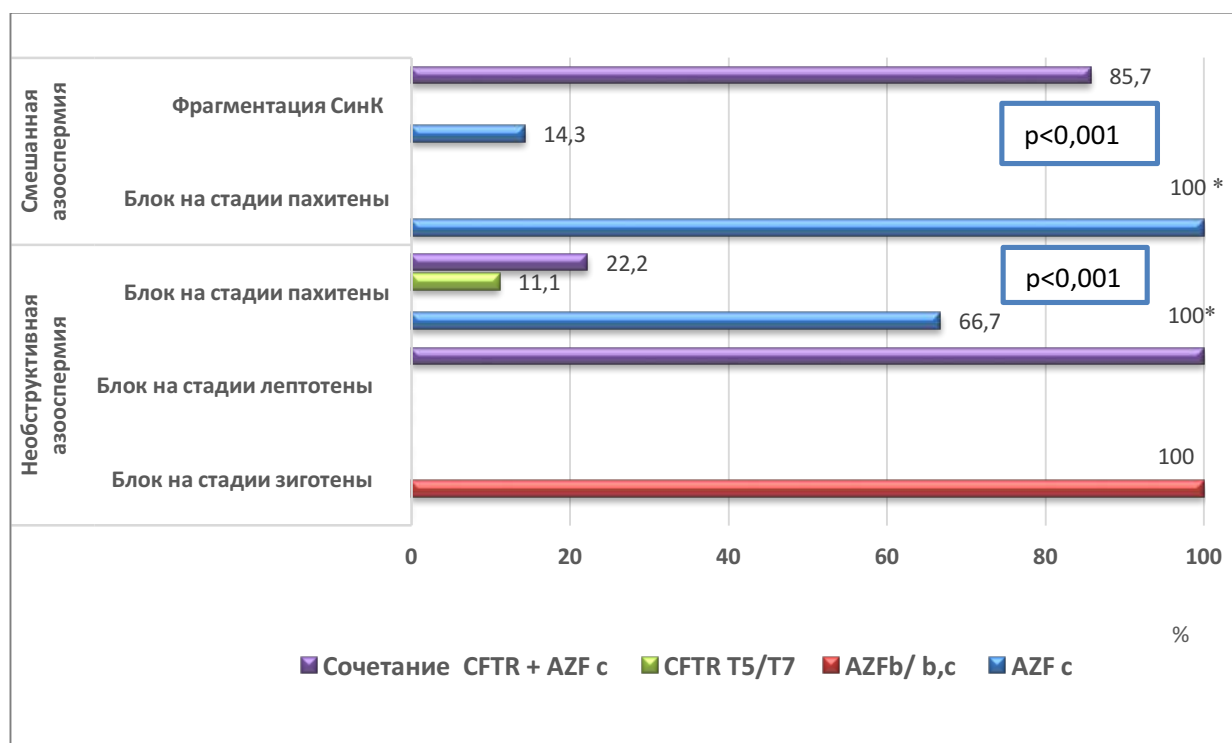


Рисунок 3.58— Стадия зиготены - множественный асинапсис хромосом в распластанном ядре сперматоцита. Осевые элементы хромосом иммуноокрашены антителами к белку SCP3 (зеленый), зоны незавершенного синапсиса хромосом - к гистону гамма H2AX (фиолетовый).

Наличие полной делеции *AZFc* (b2/b4) у 60%, *CFTR* 5T/7T (20%) и их сочетания (50%) соответствовало единичным сперматоцитам в пахитене 1-ого деления мейоза. Иммуноцитохимический профиль оказался представлен единичными ядрами на стадии ранней пахитены, синапсис хромосом в которых был полностью завершен. Половое тельце не формировалось ни в одном из ядер. Блок мейоза происходил на стадии ранней пахитены. У 20% представителей с мутантным аллелем *CFTR* 7T/7T определяли клетки всего ряда спермиогенеза вплоть до зрелых сперматид с нормальным конденсированным хроматином и сформированной акросомой. Носительство полиморфизмов *CFTR* у 60% мужчин оказалось сопряжено с выявлением единичных дегенерирующих сперматоцитов, с несформированным СинК, иногда с фрагментами осевых хромосом. Блок мейоза в группе происходил на стадии гониев и прелептотены-ранней лептотены. Наличие в единичных ядрах СинК позволяло рассматривать возможность «линии» завершенного

сперматогенеза. У 40% представителей с полной делецией AZFc во многих ядрах отмечали фрагментацию СинК, двоих – выраженную, являющуюся признаком механизма селекции сперматоцитов - мейотической катастрофы, четырех – умеренную. Сочетание частичной (gr/gr) делеции AZFc с полиморфизмом *CFTR* T5/T7 приводило к фрагментации хромосом и СинК в отдельных ядрах у 33,3% мужчин с азооспермией. Половое тельце не сформировалось ни в одном из ядер. При частичной AZF-делеции и полиморфизме *CFTR* 5T/7T в извитых семенных канальцах выявляли все стадии развития клеток сперматогенного эпителия, но вследствие блока сперматогенеза на стадии пахитены лишь часть сперматоцитов I типа переходила в деление созревания, далее – сперматиды и сперматозоиды. Таким образом, у пациентов с микроделециями локуса AZF Y хромосомы выявлена гетерогенность нарушений сперматогенеза, независимо от их типа.

Суммарные показатели особенностей характеристик СинК при различных генетических нарушениях представлены на Рисунке 3.59.



Примечание * ($p < 0,001$) – статистическая значимость межгрупповых отличий, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Рисунок 3.59 — Зависимость частоты носительства генетических полиморфизмов от особенностей состояния СинК у мужчин с азооспермией (n=77).

Наличие микроделеций генов *AZFc* зоны определяло сопряженность с блоком на стадии пахитены: при смешанной азооспермии – в полтора раза больше ($p < 0,001$), чем при НОА, *AZFb/ b,c* – на стадии зиготены.

Сочетание полиморфизмов *CFTR* + *AZFc* оказалось связано с абсолютным блоком на стадии лептотены у представителей с НОА ($p < 0,001$), фрагментацией СинК у 85,7% мужчин со смешанной азооспермией.

В группе мужчин с сочетанием микроделеций *AZFc* и *CFTR* ввиду выявления большого количества распластанных ядер (более сотни) одновременно со структурой СинК изучали процесс формирования хиазм с помощью антител к белку мисматч репарации MLH1, маркеру распределения фокусов поздней рекомбинации.

Распределение гистона гамма H2AX в ядрах сперматоцитов позволило оценить степень репарации DSB ДНК на разных стадиях профазы I мейоза (Рисунок 3.60, 3.61).

Суть прогрессии мейоза: на стадии лептотены осевые элементы хромосом формируют типичную фигуру «букета» за счет ориентации теломер хромосом к одному полюсу ядра (Рисунок 3.60 а). Отклонения от нормы на стадии зиготены, когда происходит синапсис хромосом (Рисунок 3.60 б), выявить не удастся.

Со стадии пахитены во многих ядрах выявляют отклонения от классической схемы. В норме (Рисунок 3.60) наблюдается полный синапсис аутомом с формированием 22 аутомомных бивалентов и короткого СинК между X и Y-хромосомами. В нормальных ядрах сохраняется целостность структуры СинК и формирование поздних рекомбинационных узелков в каждом аутомомном СинК и его участке между X и Y хромосомами (Рисунок 3.60 в, г). К стадии средней-поздней пахитены гистон гамма H2AX выявляется только в связи с половым (XY) бивалентом (Рисунок 3.60 г).

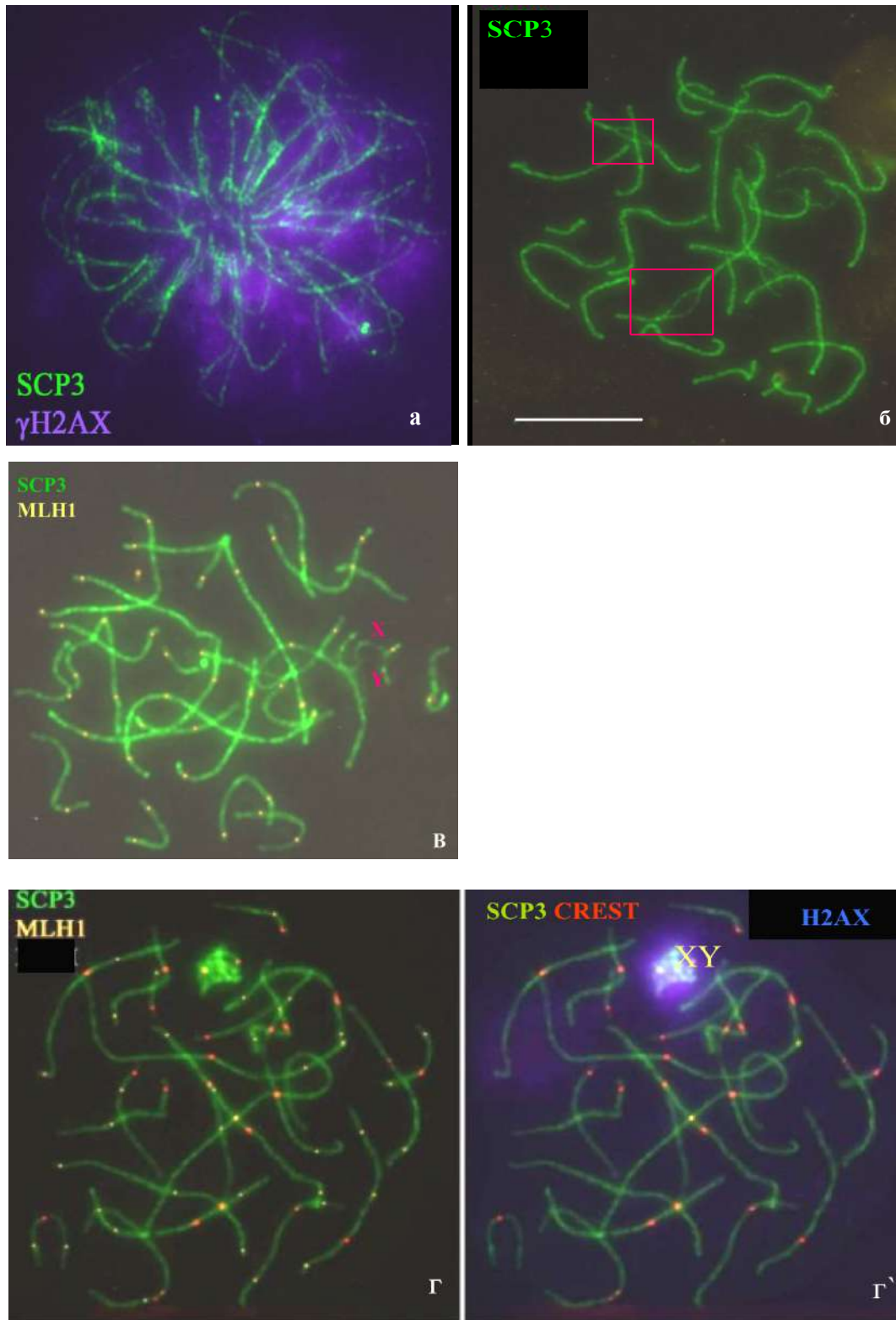


Рисунок 3.60 (а - г) — Распластанные ядра сперматоцитов

а) Стадия ранней зиготены. Осевые элементы хромосом формируют типичную фигуру «букета». Гистон гамма H2AX связан с хроматином асинапированных хромосом; б) Стадия поздней зиготены. Частичный асинапсис осевых элементов хромосом выделен красными рамками; в) Стадия ранней пахитены. На всех 22-х аутомомных СинК и в структуре полового (XY) бивалента видны фокусы белка MLH1 (желтый); г) Стадия средней-поздней пахитены. Половой бивалент (XY) формирует типичное половое тельце, в структуре которого видны фокусы белка MLH1. Фокусы MLH1 видны и в структуре всех 22-х аутомомных СинК; г) Гистон гамма H2AX выявляется только в связи с половым тельцем (XY).

Обнаружены значительные отклонения от нормы в ядрах пахитенных сперматоцитов: отсутствие сигналов белка MLH1 в структуре аутомомных хромосом и полового бивалента (Рисунок 3.61 а), нарушение архитектоники ядер и формирования структуры полового тельца – «заякоривание» его среди аутомом, фрагментация СинК вплоть до полной «пульверизации».

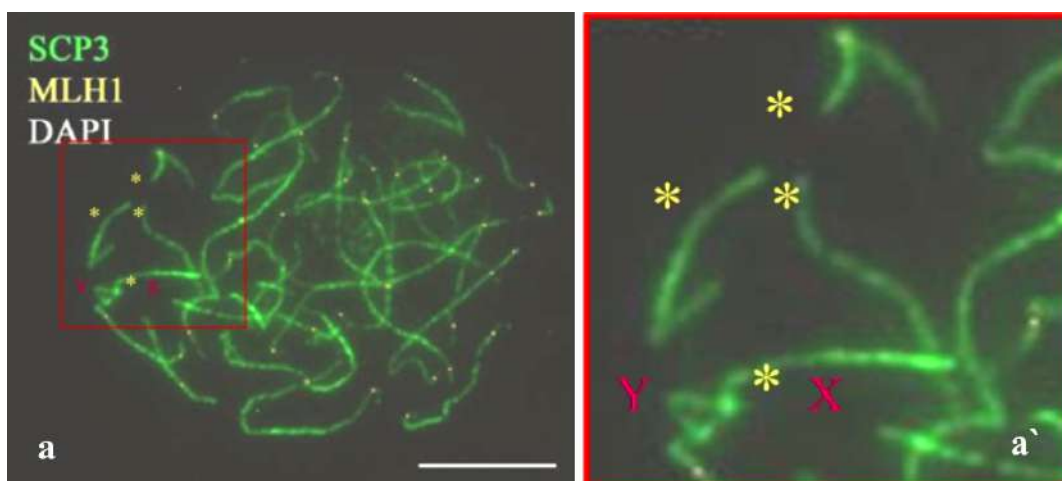


Рисунок 3.61 — Типичные нарушения в структуре СинК

а) Стадия ранней пахитены (звездочками отмечены СинК, в том числе половой бивалент, с отсутствием сигналов белка MLH1). Увеличенный фрагмент выделен красной рамкой на рис. а.

Разрывы в структуре СинК (желтые звездочки).

Селекция ядер на стадии пахитены сопровождалась отсутствием сигналов белка MLH1 в структуре отдельных СинК.

Сопоставление результатов гистологического исследования биоптатов яичек по R. McLachlan с встречаемостью генетических полиморфизмов у мужчин с азооспермией представлено в Таблице 3.20.

Неоднородность результатов гистопрепаратов при признаках «пахитенного ареста» реализовалась в наличии вариантов «нормального тестикулярного биоптата» у трети мужчин со смешанной азооспермией (33,3%) и 83,3% – ОА. Наименьшая частота заключения о гипосперматогенезе выявлена при ОА (16,7%)($p < 0,001$).

Таблица 3.20 — Патоморфологические особенности биоптатов тестикул в зависимости от состояния СинК

Группы		N	Гипосперматогенез	Нормальный биоптат	
Азооспермия обструктивная	Мейотическая катастрофа	абс.	6	0	
		%	100,0	0	
	Нарушение формирования полового тельца	абс.	6	0	
		%	100,0	0	
	Блок мейоза на стадии пахитены	абс.	12	2 ∞	10
		%		16,7	83,3
Азооспермия необструктивная	Блок на стадии зиготены	абс.	5	0	
		%	100,0	0	
	Блок на стадии лептотены	абс.	5	0	
		%	100,0	0	
	Блок мейоза на стадии пахитены	абс.	18	0	
		%	100,0	0	
	Атипичная архитектура ядра	абс.	5	0	
		%	100,0	0	
Азооспермия смешанная	Блок мейоза на стадии пахитены	абс.	12	8**	
		%		66,7	
	Фрагментация синаптонемного комплекса	абс.	8	0	
		%	100,0	0	
			∞ < 0,001		
			** 0,013		

Примечание ** ($p < 0,05$) – статистическая значимость внутригрупповых между ОА и смешанной азооспермией, ∞ - от всех групп, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Частота гипосперматогенеза при блоке мейоза на стадии пахитены при смешанной азооспермии оказалась больше, чем при ОА (66,7% против 16,7%, $p < 0,013$).

Сопоставление вариантов балльной градации морфологических изменений в образцах гистопрепаратов семенных канальцев тестикул мужчин с азооспермией с результатами анализа СинК сперматозоидов I порядка позволило установить ряд закономерностей (Таблица 3.21).

Таблица 3.21 — Морфологические характеристики биоптатов тестикул (балльная градация) в зависимости от результатов цитогенетического исследования

Группы		N	1-2//3-5//7	2//6	4//6	4-5//8-9	7//9	1-2//7-9	2-3//8-9	9-10	
Азооспермия обструктивная	Мейотическая катастрофа	абс.	6	0	0	0	0	3	0	0	3
		%		0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	50,0
	Нарушение формирования полового тельца	абс.	6	0	0	0	3	3	0	0	0
		%		0,0	0,0	0,0	50,0	50,0	0,0	0,0	0,0
	Блок мейоза на стадии пахитены	абс.	12	0	0	0	0	2	0	0	10
		%		0,0	0,0	0,0	0,0	16,7	0,0	0,0	83,3
Азооспермия необструктивная	Блок на стадии зиготены	абс.	5	0	0	5	0	0	0	0	0
		%		0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Блок на стадии лептотены	абс.	5	0	0	2	3	0	0	0	0
		%		0,0	0,0	40,0	60,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Блок на стадии пахитены	абс.	18	0	2	2	4	0	0	5	5
		%		0,0	11,1	11,1	22,2	0,0	0,0	27,8	27,8
	Атипичная архитектура ядра	абс.	5	5	0	0	0	0	0	0	0
		%		100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Азооспермия смешанная	Блок на стадии пахитены	абс.	12	0	0	0	0	6	2	0	4
		%		0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	16,7	0,0	33,3
	Фрагментация синаптонемного комплекса	абс.	8	0	0	0	0	2	0	0	6
		%		0,0	0,0	0,0	0,0	25,0	0,0	0,0	75,0

p>0,05

Гистологическое разнообразие даже в пределах одного семенного канальца объясняло регистрацию зон с различной активностью сперматогенеза (балльная оценка приведена для основных зон и очагов). Вариабельность гистогенеза («1-2//3-5//7 баллов») имела место у всех представителей с атипичной архитектурой ядра при НОА: наряду с тотальной атрофией и десквамацией сперматогенного эпителия в срезах канальцев и клеток Сертоли встречались локусы с арестом сперматогенеза на разных уровнях – от сперматогониев до сперматоцитов I-II порядка и ранних сперматид.

Заключение в «2//6 баллов», указывающее на встречаемость фокусов с клетками Сертоли и одновременно – семенных канальцев со сперматоцитами I и II типа, сделано у 11,1% мужчин с НОА и блоком мейоза на стадии пахитены.

Выявление варианта «4//6» – зон с арестом на сперматоцитах I типа (4 балла) и со сперматоцитами I и II типа у представителей с НОА указывало на очаговый характер нарушения сперматогенеза: всех – на стадии зиготены, 40% – лептотены и 11,1% – пахитены.

Наличие в образцах гистопрепаратов зон с арестом на сперматоцитах I типа и на уровне ранних округлых сперматид наряду с участками сохраненного сперматогенного эпителия («4-5//8-9 баллов») выявлено при НОА – у 60% с блоком мейоза на стадии лептотены и 22,2% – пахитены, при ОА – у половины с нарушением формирования структуры полового тельца.

Фокусы с редукцией сперматогенеза, ранними округлыми сперматидами наряду с сохраненным гаметообразованием («7//9 баллов») отличали: при ОА – у половины представителей с мейотической катастрофой и нарушением формирования полового тельца, смешанной азооспермии – четверти с фрагментацией СинК. При блоке мейоза на стадии пахитены подобную гистологическую картину выявляли у 16,7% мужчин с ОА, половины – смешанной азооспермией.

Контрастная гистологическая картина (низкие баллы по основным зонам и высокие – во фрагментах «1-2//7-9 баллов») встречалась у 16,7% мужчин со смешанной азооспермией и блоком на стадии пахитены.

Очаги с остановкой сперматогенеза на уровне сперматогониев и сохранным сперматогенным эпителием определяли у 27,8% мужчин с НОА и блоком мейоза на стадии пахитены («2-3//8-9 баллов»).

Заключение о сохранности сперматогенеза в «9-10 баллов» чаще наблюдали при блоке мейоза на стадии пахитены: 83,3% мужчин с ОА, 27,8% – НОА и трети – со смешанной азооспермией; половины – с мейотической катастрофой при ОА и 75% – фрагментацией СинК при смешанной азооспермии.

3.8 Предикторы экстракции сперматозоидов

Данные заключений пунктатов (n=209) яичек мужчин с азооспермией в зависимости от успешности манипуляций приведены в Таблице 3.22.

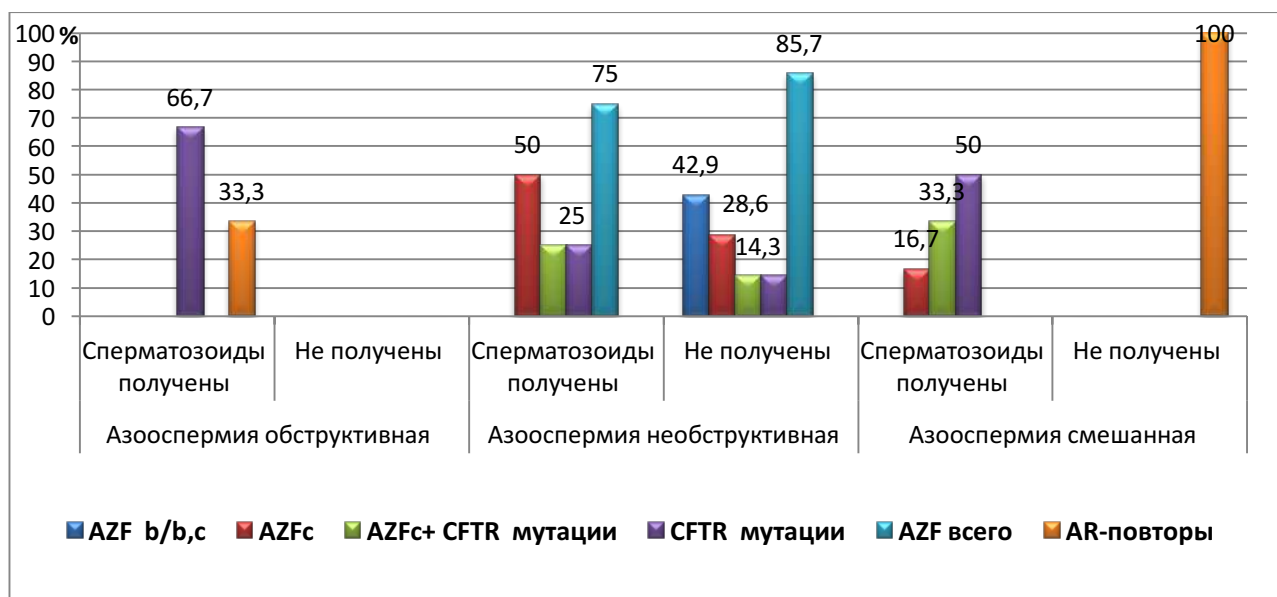
Таблица 3.22 — Гистологические характеристики яичек как предикторы вероятности экстракции сперматозоидов

Группы				N	Норма	Гипосперматогенез	Остановка развития герминогенных клеток	Сертоли-клеточный синдром	Гиалинизация семенных канальцев
Азооспермия обструктивная	Сперматозоиды	получены	абс.	59	24	35	0	0	0
			%		40,7	59,3	0,0	0,0	0,0
не получены		абс.	0	0	0	0	0	0	
		%		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Азооспермия необструктивная		получены	абс.	33	0	23	8	2	0
			%		0,0	69,7	24,2	6,1	0,0
	не получены	абс.	55	0	26	20	2	7	
		%		0,0	47,3	36,4	3,6	12,7	
Азооспермия смешанная	получены	абс.	48	3*	45 ∞	0	0	0	
		%		6,2	93,8	0,0	0,0	0,0	
	не получены	абс.	14	0	14**	0	0	0	
		%		0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	
					*<0,001	∞ <0,001; **0,004			

Примечание * (p<0,05) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, ** - от группы с НОА, ∞ - от обеих групп, точный критерий Фишера для несвязанных групп

Наличие нормального тестикулярного биоптата имело место у 40,7% представителей с ОА и эффективной экстракцией сперматозоидов при ТЕСЕ/ПЕСА. Заключение о гипосперматогенезе встречалось у 96,9% мужчин со смешанной азооспермией, независимо от эффективности тестикулярных пункций. Показатель встречаемости гипосперматогенеза у мужчин с положительным результатом исходов биопсий гонад методами микро-ТЕСЕ и ТЕСЕ/ПЕСА при НОА и ОА составил 64,5% – в полтора раза меньше, чем при смешанной азооспермии (93,8%)($p < 0,001$). Верификация данного гистологического диагноза состоялась у половины представителей с НОА и неэффективными результатами микро-ТЕСЕ (47,3%). Остановку развития герминогенных клеток отмечали несколько чаще при неэффективных пункциях тестикул (36,4% против 24,2%). Констатация СКС при положительных результатах микро-ТЕСЕ объясняется мозаичным характером спермиогенеза (6,1% против 3,6%). Гиалинизация семенных канальцев определяла неэффективность биопсий при НОА (12,7%).

Анализ влияния вариантов полиморфизмов генов *AZF*, *CFTR* и *AR* на вероятность извлечения сперматозоидов из яичка/ек в выборке мужчин с азооспермией представлен на Рисунке 3.62.

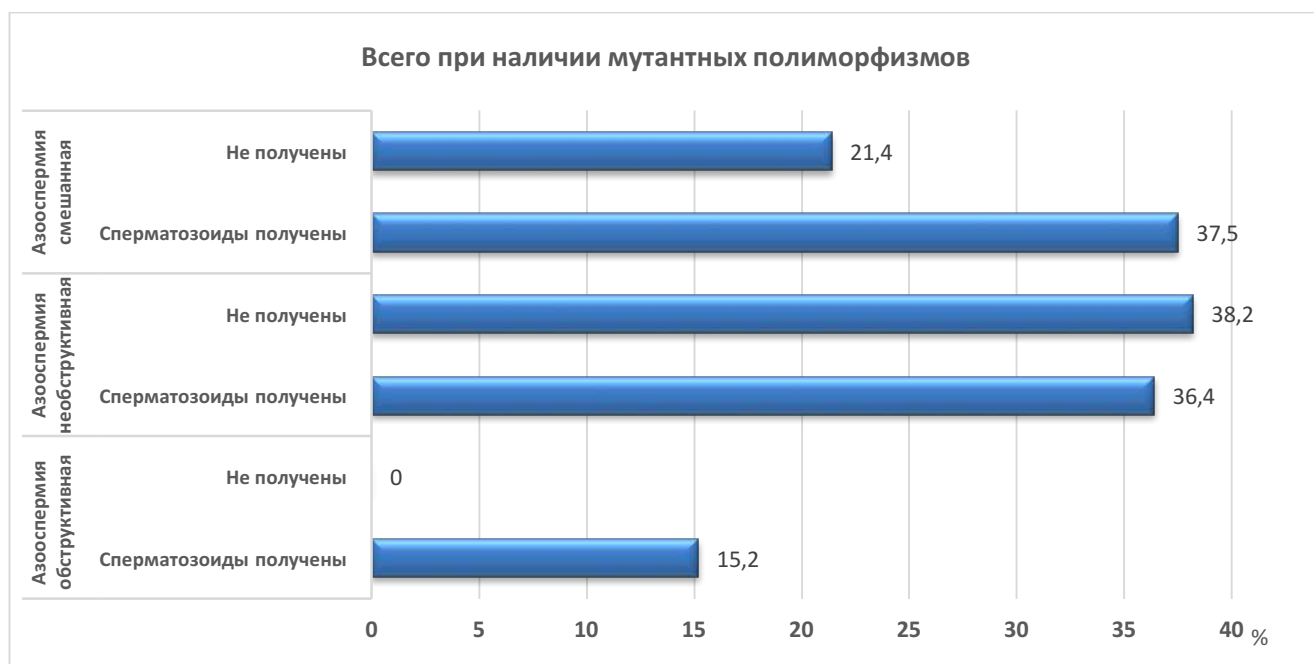


$p > 0,05$

Рисунок 3.62 — Результативность экстракции сперматозоидов в зависимости от типов выявленных генетических полиморфизмов (n=75).

Попытки экстракции сперматозоидов при пункции тестикул (микро-TESE) у носителей мутаций локусов *AZFb/b,c* оказались безуспешными (16,7%). Среди представителей с *AZFc*-делециями пригодные для ВРТ сперматозоиды были получены: при НОА – в 18,2%, смешанной азооспермии – 6,2%. Отсутствие сперматозоидов в пунктате констатировали у 10,9% мужчин с НОА. При сочетании носительства *AZFc*-делений с полиморфизмами *CFTR* у мужчин со смешанной азооспермией результативность пункций тестикул составила 18,8%, что вдвое больше в сравнении с остальными группами (9,6%). Показатель неэффективности методики микроТЕСЕ при НОА составил 5,5%. Констатация выявления сперматозоидов при *AZF*-делециях в сумме значимо не отличалась от их встречаемости при неэффективных пункциях тестикул (27,3% против 32,7%). Представителей с мутантными аллелями гена *AR* отличало отсутствие сперматозоидов в 21,4% образцов биопсий при азооспермии смешанного генеза. Отрицательный результат пункций отмечен у 5,1% мужчин с ОА.

Итоги экстракции сперматозоидов в зависимости от результатов молекулярно-генетического статуса представлены на Рисунке 3.63.



$p > 0,05$

Рисунок 3.63 — Эффективность экстракции сперматозоидов в зависимости от наличия мутантных полиморфизмов ($n=75$).

При ОА наличие «опасных» генетических аллелей не влияло на результативность получения сперматозоидов – обнаружены у 15,2%, смешанной азооспермии – показатель экстракции оказался больше в 1,7 раза. В группе с НОА вероятность их выявления при пункции яичек оказалась сопоставима с частотой отрицательных попыток (37,8% в среднем).

Результаты анализа частоты успешной экстракции сперматозоидов методами микро-ТЕСЕ и ТЕСЕ/ПЕСА в зависимости от различных параметров состояния репродуктивной системы мужчин с азооспермией представлены в Таблице 3.23.

Таблица 3.23 – Маркеры прогнозирования обнаружения сперматозоидов в гонадах методами микро-ТЕСЕ и ТЕСЕ/ПЕСА у мужчин с азооспермией (n= 260)

Параметры		получены (n=209)	не получены (n=51)
ФСГ, мМЕ/мл		8,1±1,5	10,7±2,4
ЛГ, мМЕ/мл		16,2±2,4	18,8±1,7
Ингибин В, пг/мл		142,6±15,4	120,6±9,2
Тестостерон общий, нмоль/л		12,7	17,3
Тестостерон/эстрадиол		365,8/105,4 = 3,3	498,2/80,2 = 6,2
Объем яичек, мл		12,8±5,6	9,8±4,2
Гипосперматогенез (n=143)	абс.	103	40
	%	72,0	27,9
Сертоли-клеточный синдром (n=4)	абс.	2	2
	%	50,0	50,0
Остановка развития герминогенных клеток (n= 28)	абс.	8	20
	%	28,6	71,4
AZFc (n= 15)	абс.	9	6
	%	60,0	40,0
AZFc+ CFTR мутации (n= 12)	абс.	9	3
	%	75,0	25,0
CFTR мутации(n=21)	абс.	18	3
	%	85,7	14,3
AR-повторы (n=6)	абс.	3	3
	%	50,0	50,0
Эффективность медикаментозной подготовки (стимуляция сперматогенеза) (n=173)	абс.	158	15
	%	63,2	24,2

Поиск предикторов эффективной экстракции сперматозоидов из яичка/ек показал отсутствие статистически значимых различий показателей ФСГ, ЛГ, ингибина В, Тест, эстрадиола и их соотношения, объема яичек в группах с результативными и безуспешными попытками манипуляций, как и в отношении наличия микроделеций локуса *AZFc*, мутантных полиморфизмов *CFTR*, их сочетания, *AR*-повторов.

Вероятность выявления сперматозоидов определяло наличие гипосперматогенеза (72,0% и 27,9%, Хи-квадрат – 19,4, $p < 0,01$, коэффициент сопряженности Пирсона – связь средней силы – 0,33), негативный результат возрастал при заключении об «остановке развития герминогенных клеток» – при обратном соотношении (28,6% и 71,4%, Хи-квадрат – 16,3, $p < 0,01$, коэффициент сопряженности Пирсона – связь средней силы – 0,3).

Назначение медикаментозной терапии преследовало целью стимуляцию сперматогенеза: препаратами ХГЧ (прегнил 1500 МЕ 2 раза в неделю внутримышечно на 3-6 месяцев), ИА (анастрозол 1 мг – по 1 таблетке 1 раз в сутки на 6 мес), рФСГ (Гонал Ф, МЕРК, Германия) – через день по 75МЕ, его комбинацией с ХГЧ – 1500 МЕ дважды в неделю).

Одновременно осуществляли метаболическую и антиоксидантную терапию (карнитон 1000 мг 2 раза в день, препараты цинка, мексидол 5,0 мл внутримышечно 1 раз в день первые 10 дней каждого месяца вплоть до оперативного извлечения сперматозоидов). Контроль уровня ФСГ и Тест_{общ} позволял корректировать дозу препаратов. Повторную оценку уровня гонадотропинов проводили через 4-6 месяцев после лечения.

Эффективность медикаментозного этапа (выявление сперматозоидов) подтверждена статистически: (63,2% и 24,2%, Хи-квадрат – 30,6, $p < 0,01$, коэффициент сопряженности Пирсона – связь средней силы – 0,3).

Влияние дооперационной медикаментозной подготовки на стимуляцию сперматогенеза в гонадах реализовалось в некотором снижении уровня ФСГ (Таблица 3.24).

Таблица 3.24 — Влияние медикаментозной терапии как подготовительного этапа к экстракции сперматозоидов из яичка на параметры гипофизарно-гонадного профиля мужчин с азооспермией (n=173)

Гормональные параметры	До медикаментозной терапии	После медикаментозной терапии
ФСГ	11,8±2,7	8,0±1,8
ЛГ	18,3±2,2	17,1±2,4
Эстрадиол	96,8±6,6	84,8±7,3
Тестостерон	368,6	501,1*
Тестостерон/эстрадиол	3,8	5,9*
		* 0,001
		* 0,05

Примечание * (p<0,05) – статистическая значимость отличий показателей до и после лечения, тест Стьюдента-Ньюмана-Кейлса

Исходом медикаментозной коррекции тестикулярной недостаточности стало возрастание значения индекса соотношения Тест_{общ} к эстрадиолу (p <0,05) на фоне изменения содержания исследуемых гормонов с некоторым возрастанием андрогенной фракции (p <0,001).

Резюме:

Результаты гормонального исследования (оценка состояния ГТ-ГФ-гонадной системы) показали:

- гипергонадотропное состояние выявляли чаще при НОА (58,1%) и у 3,8% мужчин со смешанной азооспермией; гипогонадотропное – у 7,6% и 17,7% соответственно; нормогонадотропное – всех с ОА (100,0%), 78,5% – со смешанной азооспермией и трети – НОА;
- типы нарушений тестикулярной функций: нормальная функция яичек – чаще при ОА (81,6% против 68,4% у мужчин со смешанной азооспермией и 18,1% – НОА); гипогонадизм – 81,9% мужчин с НОА, трети – со смешанной азооспермией (31,6%), реже всего – при ОА (18,4%);

- при гипергонадотропном состоянии (изолированной форме по ФСГ или ЛГ) нормальная функция яичек встречалась у 21% мужчин с НОА, гипогонадизм – 37,1% с НОА и 3,8% – смешанной азооспермией;
- гипогонадотропное состояние с нормальной функцией яичек – только у 2,9% мужчин с НОА, гипогонадизмом – преобладало при смешанной азооспермии (17,7% против 4,8%);
- нормогонадотропное состояние в сочетании с гипогонадизмом определено у 14,9% мужчин с азооспермией;
- гипотрофия одного яичка выявлена в 22,8%, обоих – у 46,7% мужчин с НОА, четверти – со смешанной азооспермией и 10,5% – ОА. Гипоплазия яичек встречалась только при НОА – 26,7%. Суммарный показатель уменьшения объема яичек при НОА и смешанной азооспермии составил 54,8%, ОА – 10,5%;
- нормальный объем яичек выявлен у 89,5% мужчин с ОА, половины – со смешанной азооспермией и 14,3% – НОА;
- по результатам гормонального скрининга: наиболее высокие показатели ФСГ и ЛГ выявлены при НОА (гипергонадотропная форма гипогонадизма); резкое снижение уровня ингибина В – вдвое больше – при смешанной азооспермии, в четыре раза – ОА;
- снижение при НОА среднего уровня биодоступного тестостерона, при сопоставимых показателях Тест_{общ} и Тест свободного;
- высокие показатели инфекционно-воспалительной заболеваемости мужчин с азооспермией: анаэробные инфекции в диагностически значимых титрах – у четверти мужчин со смешанной азооспермией, 13,2% – ОА, 5,7% – НОА; микоплазменной инфекции – чаще при НОА (10,5%), уреаплазменной – при смешанной азооспермии (29,1%), как и ВПГ 2 типа – втрое в сравнении с остальными типами (12,7% против 4,8%);

- бактериология эякулята/секрета предстательной железы мужчин с азооспермией показала ее инфицирование в 42,1% при ОА, 27,6% – НОА, 37,9% – смешанном варианте; спектр выделяемой флоры – преобладание энтерококка при ОА (27,6%) вдвое больше, чем других типах азооспермии (13,9% в среднем); кишечной палочки – 18,4% и 10,7% соответственно;
- текущее обострение хронического простатита выявлено у 10,4% представителей с ОА и 7,8% – со смешанной азооспермией, преимущественно за счет инфектов энтеральной группы;
- микробная контаминация эякулята и секрета простаты преобладала при ОА; лейко- и бактериоспермия у 27,7% мужчин с ОА и смешанной азооспермией;
- результаты молекулярно-генетического исследования мужчин с азооспермией: хромосомный полиморфизм (10,4%), наличие немозаичной формы СК (кариотип 47,XXY) у шести мужчин (5,7%) с НОА при суммарном количестве числовых и структурных аномалий хромосом в 16,1%. Микроделеции в локусе AZFc выявлены у 14,2% мужчин с азооспермией, AZFb/b,c – только при НОА (8,6%);
- микроделеции в AZF регионе выявлены: при НОА – в 25,7%, смешанной азооспермии – 11,4%; частичные – в 19% и 11,4% соответственно; полные – у 6,7% мужчин с НОА (AZFb/b,c – 2,8% и AZFc – 3,8%); удельный вес AZFc *sY 1192* – при НОА оказался в полтора раза больше (8,6% против 5,1% при смешанной азооспермии);
- микроделеции AZFc 1291 при НОА встречались в 4,8%, в два раза меньше – при смешанной азооспермии (2,5%). Мутации в регионе AZFc 254, 255 определены только при НОА – в 3,8%, AZFb – 2,9%.
- Мутации в регионах AZFb,c – частичные и множественные (5,7%) встречались только в группе с НОА;

- полиморфизмы гена *CFTR* при смешанной азооспермии выявляли чаще (19,0%) (7Т/9Т – 16,5%), чем с другими типами (9,6%);
- частота мутаций в локусе *AZFc* – 14,2% при НОА и смешанной азооспермии, *AZFb* или *AZFb,c* – 8,6% при НОА;
- встречаемость *CAG* полиморфизмов в гене *AR* составила 3,8% – у представителей с НОА и смешанной азооспермией;
- суммарная частота аномальных генетических полиморфизмов: 11,8% при ОА и 35,6% – в остальных группах;
- соотношение объема яичек и носительства мутантных генетических полиморфизмов:

при НОА:

- гипотрофия яичек – при делециях субрегиона *AZFc* – у 75% и половины – с полиморфизмами гена *CFTR* и их комбинаций;
- гипоплазия гонад – *AZFb/b,c* (66,7%);
- нормальный объем яичек (при различных вариантах мутаций генов *AZF* и *CFTR*, за исключением локуса *AZFb/b,c*).

При смешанной азооспермии:

- гипотрофия яичек – при мутациях гена муковисцидоза *CFTR* (66,7%), *AR* (100%);
- объем гонад, соответствующий нормальным значениям – при микроделециях *AZFc* и их комбинации с *CFTR*;
- особенности ГТ-ГФ-гонадной системы и делеций в *AZF* регионе Y хромосомы, полиморфизмов генов *CFTR* и *AR* мужчин с азооспермией:

В группе с НОА:

- при микроделециях в субрегионе *AZFb/b,c* преобладание гипергонадотропного состояния: с гипогонадизмом – у 66,7%, нормальным объемом тестикул – у трети;
- в локусе *AZFc*: у 75% – нормальная функция яичек, 25% – нормогонадотропный гипогонадизм;

- при полиморфизме гена *CFTR* превалировала гипергонадотропная форма гипогонадизма, при сочетании с микроделецией локуса *AZFc* – у половины, остальных – без нарушения функции яичек.

При смешанной азооспермии:

- наличие гипогонадизма: нормогонадотропного – при *CAG* полиморфизме гена *AR*, гипогонадотропного – делеции *AZFc*;
- при полиморфизме гена *CFTR* – нормогонадотропный гипогонадизм у 66,7%, трети – гипогонадотропный гипогонадизм;
- при сочетании мутации гена *CFTR* и *AZFc*-делеции – без нарушения функции яичек.

При ОА: независимо от типа генетических мутаций (*CFTR* и *CAG*-повторов *AR*) – нормальная функция яичек.

Микрохирургическая биопсия яичка/ек и его придатка у мужчин с азооспермией выполнена:

- микро-ТЕСЕ – у 32,5% с ОА, 62,9% – со смешанной и 94,9% – НОА;
- ТЕСЕ+ПЕСА – у 67,4% мужчин с ОА, 37% – со смешанной и 5,1% – НОА;
- эффективность экстракции пригодных для оплодотворения сперматозоидов методом ИКСИ: при ОА – в 100%, смешанной азооспермии – в 97%, 50,4% – НОА.

Гистологическая оценка биоптатов тестикул при азооспермии:

- материал получен – у 83,8% мужчин с НОА и 78% – с другими типами;
- оценка состояния ткани яичка по шкале Johnsen:
- 10 баллов (нормальный сперматогенез) – у 40,7% в группе с ОА и смешанной азооспермией - 6,5%;
- 9 баллов – у 40,7% мужчин с ОА, 29% - смешанной азооспермией и 4,5% с НОА;
- 8 баллов – чаще при смешанной азооспермии, чем НОА (45,2% против 14,8%);

- 7 баллов (блок сперматогенеза на уровне ранних сперматид) – у 19,4% мужчин со смешанной азооспермией и 9,1% – в остальных группах;
- 6-ти балльная оценка с угнетением продукции пула половых клеток и ранних сперматид – у 12,5% мужчин с НОА;
- 5 баллов (преобладание сперматогониев) – у 10% представителей группы с ОА и НОА;

Для представителей с НОА:

- блок на уровне сперматоцитов I порядка с сокращением их продукции (4 балла) (26,1%);
- нарушение сперматогенеза на этапе развития сперматогониев – в 4,5% (3 балла);
- заключение о «Сертоли-клеточном синдроме» (2 балла) и отсутствие клеточного пула (1 балл) – в 9,1%.

Оценка сперматогенеза при исследовании по R.I. McLachlan показала:

- гипосперматогенез – у 57,5% мужчин с ОА и НОА, 95,2% – смешанной азооспермией;
- в группе с НОА – остановка развития герминогенных клеток – в 31,8%, СКС – 4,5%, гиалинизация семенных канальцев – 7,9%;
- нормальный тестикулярный биоптат – у 40,7% мужчин с ОА и 4,8% – смешанной азооспермией ($p < 0,05$);
- расхождение заключений о нормальном сперматогенезе при смешанной азооспермии по классификациям Johnsen и McLachlan – в 1,7% (6,5% и 4,8% соответственно);
- гистологическая гетерогенность выявлена: при смешанной азооспермии – в 61%, НОА – 77,3%, ОА – 27,4%.
- сохранность сперматогенеза с клеточными фигурантами всех стадий развития определена у 37,1% в группе с ОА и 10,2% – смешанной азооспермией.

Гистологическое разнообразие в пределах одного семенного канальца установлено за счет ряда вариантов:

- «низкие баллы по основным зонам и фрагментам – 1-2//1-6 баллов» – превалирование на фоне СКС канальцев с блоком на уровне сперматогоний/сперматоцитов/ранних сперматид у 26,1% мужчин с НОА;
- «низкие баллы по основным зонам и средние – фрагментам - 1-4//7 баллов» у 4,5% в группе с НОА;
- «низкие баллы по основным зонам и высокие – во фрагментах – 1-5//8-9 баллов» – блок сперматогенеза на уровне ранних сперматид и скудные участки сохраненного сперматогенного эпителия в 35,6% образцов мужчин со смешанной азооспермией, 17,7% – с ОА и 26,1% – с НОА;
- единая балльная отметка в образцах биоптатов 72,6% мужчин с ОА, смешанной азооспермией (39%) и НОА (22,7%).

В результате микроTESE при НОА пригодные для ВРТ сперматозоиды получены у половины мужчин с мутациями гена *CFTR* и микроделецией локуса *AZFc*, их сочетанием:

Неэффективность пункций яичек/их придатков:

- у носителей делеции субрегиона *AZF b/b,c*;
- при наличии *AR*-повторов при смешанной азооспермии.

Вариабельность гистологического разнообразия выявлена:

- при носительстве *AZFb/b,c* у двух третей мужчин с НОА – СКС, трети – гипосперматогенез;
- при микроделеции локуса *AZFc* «клеточный арест» у четверти представителей, половины – гипосперматогенез;
- при мутации гена *AR* – во всех образцах гипосперматогенез;

- картина завершеного сперматогенеза при смешанной азооспермии, независимо от наличия и типов генетических мутаций и ОА – кроме носителей *AR* ввиду невозможности забора материала.

При наличии микроделеций в *AZFc* локусе у четверти мужчин с НОА определяли мозаичные очаги «1-2//3-4 балла»: на фоне СКС участков канальцев с блоком на уровне сперматогоний/сперматоцитов; у половины мужчин – сохранность очагов сперматогенного эпителия при блоках сперматогенеза на уровне ранних сперматид («5-6//8, 5//8-9 баллов»).

В группе с полиморфизмами гена *CFTR*:

- в 50% образцов – от аплазии герминогенных клеток и очагового СКС до участков с нарушением вызревания сперматид («1-2//4-5 баллов»);
- в 50% – сохранность очагов сперматогенеза («7//8-9 баллов»).

Сочетание мутаций генов *CFTR* с микроделециями в *AZFc* локусе определяла вариабельность образцов: в 50% – «3//3-4 баллов», в 50% – «5-6//8, 5//8-9».

Оценка в «5-6//8, 5//8-9 баллов» выявлена:

- при смешанной азооспермии – у 100% с микроделециями *AZFc*;
- 66,7% – с мутантными полиморфизмами *CFTR*;
- 50% – с сочетанием мутаций *AZFc* и *CFTR*.

Заключение об отметке в «9-10 баллов» встречалось у трети мужчин с полиморфизмами *CFTR* и половины – их сочетания с мутациями в *AZFc* локусе.

Носительство мутаций гена *AR* отличалось «полярностью» заключений – зоны в «2//8 баллов» – участков соответствия СКС и одновременно – возможности экстракции сперматид, пригодных для оплодотворения в программах ЭКО-ИКСИ.

В группе с ОА гистологические заключения сделаны только для носителей мутации *CFTR* – «7//8-9 баллов».

Результаты ЭМИС у мужчин с азооспермией показали:

- содержание головок сперматозоидов с нормальной формой ядра у 78% в среднем;
- аномальная форма ядра – у четверти мужчин с НОА и смешанной азооспермией – в среднем, 24,6%, 16,7% – при ОА;
- зрелость хроматина – у 75% представителей с ОА и 43,7% в остальных группах;
- преобладание сперматозоидов с вакуолизацией ядер и зрелым гомогенным хроматином – у 36,4% мужчин с НОА и 27,5% – с другими типами азооспермии;
- «незрелый» хроматин в 30% и более головок зрелых сперматид у мужчин с НОА (39,4%) и в остальных группах (12,5% при ОА и 25,0% – смешанной азооспермии);
- незначительное количество сперматозоидов с нарушением компактизации хроматина (менее 30%) при НОА (18,2%) и 30% – со смешанной азооспермией, 12,5% – ОА;
- показатель сперматозоидов с нормальным положением акросомы у всех представителей с ОА и 93,6% – со смешанной азооспермией и НОА;
- содержание головок сперматозоидов с акросомой атипичного строения, связываемое с нарушением их пенетрационной способности у 9,5% мужчин с НОА и смешанной азооспермией;
- сниженное количество интактных головок сперматозоидов – нормальной формы с нормальным строением хромосомы и акросомы (норма - 4%) отличало 16,7% представителей с ОА и НОА и 9,5% – смешанной азооспермией;
- показатель незрелых половых клеток оказался наибольшим при НОА (60,6%) против 25,0% при смешанной азооспермии;

- формирование многослойной структуры базальной мембраны у 72,7% представителей группы с НОА и 25% – смешанной азооспермией.

Характеристики органоидов гамет в зависимости от наличия мутантных генетических полиморфизмов: частота $NX < 30\%$ составила 100% при наличии в генотипе варианта CFTR 5T/7T. Многослойность БМ выступала отличительной характеристикой представителей с делециями AZF зоны Y-хромосомы.

Анализ СинК сперматоцитов I порядка показал:

- блок сперматогенеза на стадии пахитены профазы I мейоза путём «заякоривания» бивалентов при азооспермии (54,8% в среднем);
- нарушение формирования структуры полового тельца в мейозе как варианта морфоструктурной основы «пахитенного ареста» – у 25% мужчин с ОА;
- при НОА – с равной частотой (15,2%) – атипичную архитектуру ядра, блок сперматогенеза на стадии зиготены, лептотену профазы I мейоза;
- выраженная фрагментация хромосом, мейотическая катастрофа типичны для 40% мужчин со смешанной азооспермией и четверти – с ОА.

Соотношение состояния ГТ-ГФ-гонадной системы с результатами цитогенетического исследования гамет показало:

- нормогонадотропный гипогонадизм при ОА у всех мужчин с мейотической катастрофой, половины – нарушением формирования полового тельца, смешанной азооспермии – четверти с фрагментацией СинК;
- нормогонадотропный гипогонадизм при всех типах азооспермии, с блоком мейоза на стадии пахитены: 66,7% со смешанной азооспермией, 22,2% – НОА и трети – ОА;

- эугонадизм – у мужчин с НОА и блоком мейоза на стадии лептотены, 75% – со смешанной азооспермией и фрагментацией СинК; с блоком мейоза на стадии пахитены – у 66,7% с ОА и трети – смешанной азооспермией;
- «гипергонадотропное по ЛГ состояние» – при НОА, с блоком мейоза на стадии зиготены и 38,9% – пахитены, «по ФСГ» – у 22,2% с «пахитенным арестом»;
- остановка дифференцировки сперматоцитов I порядка на стадии лептотены-ранней зиготены с дальнейшим завершением синапсиса хромосом только в 5% клеток.

При смешанной азооспермии тотальную фрагментацию СинК и осевых элементов хромосом – признак селекции на стадии зиготены – пахитены в 90% клеток определяли у 25% мужчин с нормогонадотропным гипогонадизмом (объем фрагментации оказался различен) и 75,0% – эугонадотропным состоянием.

Состояние СинК отличалось в зависимости от типов AZF-микроделений: полных (AZFb и AZFb+c) – выступало маркером выраженного угнетения сперматогенеза, с признаками мейотической катастрофы у 60% мужчин и в 40% – блоком мейоза на стадии зиготены.

При наличии полиморфизма *CFTR* 7T/7T: в 20% выявляли наличие клеток всего ряда спермиогенеза вплоть до зрелых сперматид, в 60% – единичные дегенерирующие сперматоциты с несформированным СинК.

При полной микроделеции AZFc: в 40% во многих ядрах отмечали фрагментацию СинК.

Суммарные показатели особенностей характеристик СинК при наличии различных генетических полиморфизмов:

- микроделециях гена AZFc – сопряженность с блоком на стадии пахитены, AZFb/ b,c – зиготены;

- сочетании полиморфизмов *CFTR* + *AZFc* – с блоком на стадии лептотены у представителей с НОА, фрагментацией СинК у 85,7% мужчин со смешанной азооспермией.

Гистологические особенности биоптатов гонад в зависимости от состояния СинК:

- при признаках «пахитенного ареста»: нормальный тестикулярный биоптат – у 33,3% мужчин со смешанной азооспермией и 83,3% – ОА; гипосперматогенез – у 16,7% с ОА и 66,7% – смешанной азооспермией;
- при остальных вариантах дефектов формирования СинК – констатация гипосперматогенеза (100%).

Гистологическое разнообразие в пределах семенного канальца – в соответствии с результатами анализа СинК сперматоцитов I порядка:

- вариабельность гистогенеза (1-2//3-5//7 баллов) у всех представителей с атипичной архитектурой ядра при НОА;
- очаговый характер нарушения сперматогенеза при НОА: всех – на стадии зиготены, 40% – лептотены и 11,1% – пахитены;

Вероятность выявления зрелых половых клеток:

- при ОА – при наличии мейотической катастрофы, нарушении формирования структуры полового тельца, блоке мейоза на стадии пахитены;
- смешанной азооспермии – фрагментации СинК, блоке мейоза на стадии пахитены;
- при НОА – (4-5//8-9 баллов) – у 60% с блоком мейоза на стадии лептотены и 22,2% – пахитены; (2-3//8-9 баллов) – блоком мейоза на стадии пахитены (27,8%) и 9-10 баллов – при аналогичном нарушении СинК.

Предикторы экстракции пригодных для использования в программах ЭКО сперматозоидов:

- гистологические характеристики семенных канальцев гонад: «нормальный» тестикулярный биоптат – у 40,7%, гипосперматогенез – 93,8% мужчин со смешанной азооспермией и 64,5% – остальных типах;
- при AZFc-делециях: при НОА – в три раза чаще, чем при смешанной азооспермии (18,2% против 6,2%);
- сочетание AZFc-делеций с полиморфизмами *CFTR* – при смешанной азооспермии (18,8%) и 9,6% – других ее типах.

Итоговый анализ поиска предикторов выявления сперматозоидов при пункциях гонад:

- отсутствие значимой роли уровней ФСГ, ЛГ, ингибина В, Тест, эстрадиола и их соотношения, объема яичек, микроделеций локуса AZFc, мутантных полиморфизмов *CFTR*, их сочетания, *AR*-повторов;
- наличие гипосперматогенеза (72,0% и 27,9%, Хи-квадрат – 19,4, $p < 0,01$, коэффициент сопряженности Пирсона – средняя связь – 0,33),
- После медикаментозной терапии выявлен прирост уровня Тест_{общ.}, коэффициента соотношения Тест_{общ.}/Е₂.

ГЛАВА 4

РЕЗУЛЬТАТЫ ВЕДЕНИЯ МУЖЧИН С СИНДРОМОМ КЛЯЙНФЕЛЬТЕРА

В отделении ВРТ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России с 2013 по 2017 гг. обследовано 18 пациентов с немозаичной формой СК в возрасте от 15 до 35 лет.

Кроме шести подростков, все мужчины состояли в браке и желали реализовать свою репродуктивную функцию. Верификация диагноза СК у 14 пациентов проведена в пубертатном периоде, четырех мужчин - только после обращения в отделение ВРТ с жалобами на отсутствие беременности в браке. Возраст их варьировал от 24 до 32 лет.

В диссертационное исследование включены шесть человек¹: в программу ЭКО-ИКСИ-микро-ТЕСЕ включены четверо мужчин в возрасте от 22 до 30 лет и два подростка 15 и 16 лет (после подписания информированного добровольного согласия на участие в исследовании и манипуляции – микро-ТЕСЕ) с целью экстракции сперматозоидов. Для подростков планировалась криоконсервация материала при его получении (при заинтересованности в дальнейшей реализации репродуктивной функции).

Все пациенты имели евнухоидный тип телосложения с уровнем вирилизации по Таннеру 4 балла, крипторхизм не выявлен. Варикоцеле отмечено по одному случаю в каждой группе.

В ходе операции микродиссекции яичка/ек у юноши 15-ти и мужчины 22-х лет были найдены сперматозоиды (Рисунок 4.1).

¹ Материалы исследования опубликованы в журнале «Проблемы репродукции». 2017; 26(4): 24-32. Витязева И.И., Мун Т.В., Лютый Р.Ю., Разина О.Ю., Дедов И.И. Этиологические и патогенетические аспекты немозаичной формы синдрома Клайнфельтера

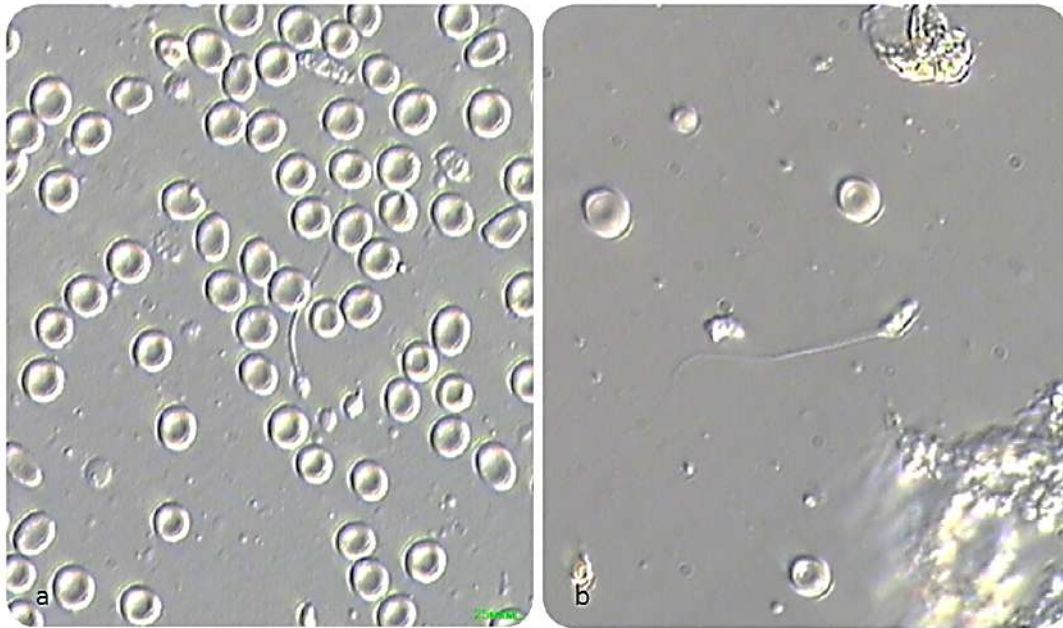


Рисунок 4.1 — Биопсийный материал канальцев семенника пациентов с немозаичной формой СК. а - возраст 15 лет, б - возраст 22 года.

Единичные сперматозоиды пациента 15 лет подвергли криоконсервации (витрификации) с целью реализации репродуктивной функции в будущем. Извлеченные тестикулярные сперматозоиды пациента 22 лет использовали для оплодотворения ооцитов супруги методом ИКСИ, часть – криоконсервирована.

В зависимости от результата микро-ТЭСЕ пациенты были разделены на две группы: с положительным и неэффективным исходами. С целью поиска предикторов эффективности пункций тестикул проанализирован ряд параметров, характеризующий эндокринно-метаболический профиль обследуемых с немозаичной формой СК (Таблица 4.1).

Таблица 4.1 — Клиническая характеристика пациентов с немозаичной формой СК

Характеристики	Микро-ТЕСЕ					
	результативная		нерезультативная			
Возраст, лет	15	22	16	28	28	30
V правого яичка, мл	1,9	2,1	1,8	2,4	2,3	2,5
V левого яичка, мл	1,8	1,5	1,8	2,6	2,8	2,3
ФСГ(мМЕд/л)	34,3	63,0	40,4	39,6	37,3	35,2
ЛГ (мМЕд/л)	21,2	33,9	18,5	10,9	19,4	13,1
Ингибин В (пг/мл)	15,2	2,6	9,8	14,0	2,6	2,6
Тестостерон общий (нг/дл)	221,8	377,3	262	207,4	155,2	264,
ИМТ кг/м ²	21,0	24,6	23,1	37,0	25,8	26,3
Развитие по Таннеру	4б	4б	4б	4б	4б	4б
Гинекомастия	нет	нет	нет	да	да	да
Половое созревание/ крипторхизм	14/ нет	16/ нет	14/нет	18/нет	17/нет	16/нет
Варикоцеле	нет	ВЦЭ слева	нет	Да, слева	нет	нет
Заместительная терапия андрогенами	нет	нет	нет	5 лет	3 года	2 года Эпизодически

При анализе параметров объема яичек и гормонального статуса представителей обеих групп существенных отличий не выявлено. Несмотря на малый объем выборки, в группе с отрицательным результатом пункций яичек преобладали мужчины старшего возраста, ранее получавшие заместительную терапию препаратами тестостерона от двух до пяти лет, с ИзбМТ, ожирением и гинекомастией.

Микроскопическое исследование биопсийного материала яичек шести пациентов с СК отличалось гистологической вариабельностью (Рисунок 4.2).

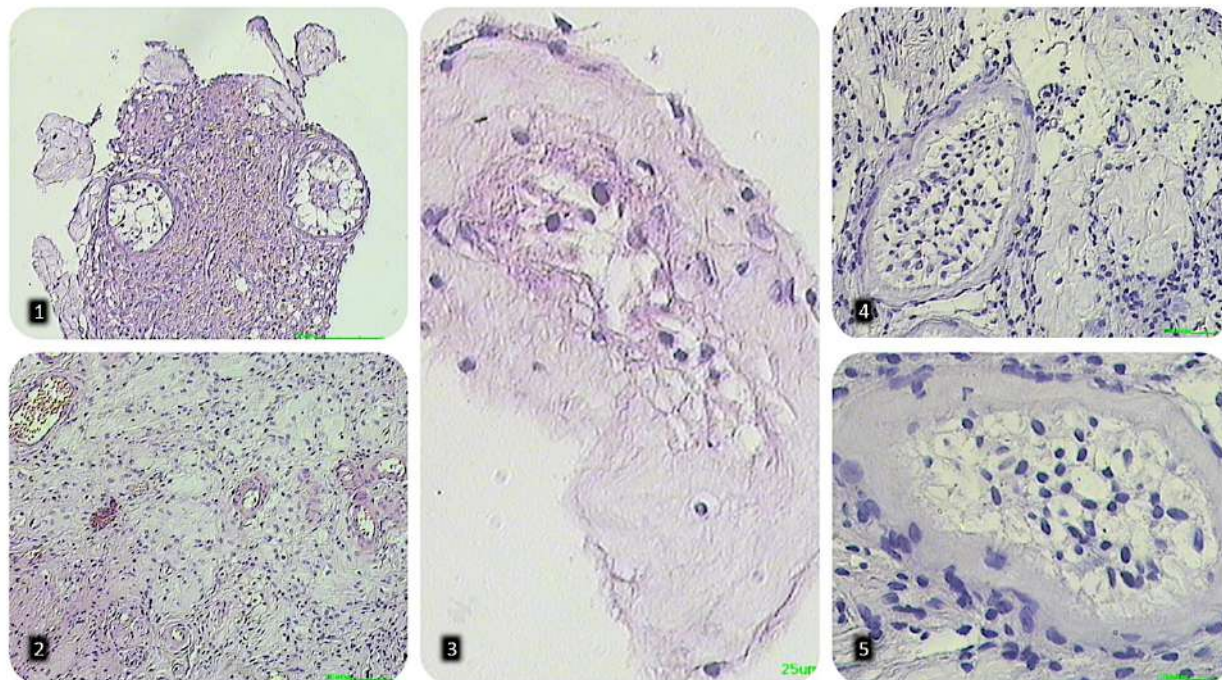


Рисунок 4.2 — Биопсийный материал тестикулярной ткани мужчин с немозаичной формой СК. Гематоксилин-эозин.

4.2.1 Ув. X40. Возраст-28 лет 1-дегенеративные извитые семенные канальцы с аплазией герминативного эпителия; 2-полный Сертоли-клеточный синдром; 3- тестикулярный фиброз

4.2.2 Ув. X100. Возраст-30 лет. Полная дегенерация извитых семенных канальцев («тени канальцев»)

4.2.3 Ув. X400. Возраст-28 лет, гиалиноз семенного извитого канальца, полная дегенерация сперматогенного эпителия

4.2.4 Ув. X100. Возраст-22 года. 1-гиалинизированный извитой каналец с сохранным сперматогенезом; 2-тени канальцев

4.2.5. Ув. X200. Возраст-22года. Гиалиноз семенного извитого канальца, с сохранным сперматогенезом

Характерная для всех образцов частичная/полная атрофия извитых семенных канальцев (Рисунок 4.2.1, 4.2.2, 4.2.4) проявлялась в утрате сперматогенного эпителия и гиалинизации канальцев. На месте эпителия извитого семенного канальца визуализировали либо клеточные тени (Рисунок 4.2.2, 4.2.3), либо клетки Сертоли (Рисунок 4.2.1). Дистрофия соединительной ткани канальцев реализовалась гиалинозом, с агрегацией склеропротеинов со сходными физическими и тинкториальными свойствами

(гомогенность, аморфность) и по объему превосходящий исходно занимаемый (Рисунок 4.2.5). Гистологическая гетерогенность заключалась в наличии тестикулярного фиброза (Рисунок 4.2.1), тотальной дегенерации извитых семенных канальцев (Рисунок 4.2.2) наряду с канальцами с сохранным сперматогенезом (Рисунок 4.2.4).

Поиск предикторов успешного извлечения сперматозоидов при микро-ТЕСЕ объясняет целесообразность сопоставления результатов пункции тестикул с различными факторами – от анамнестических до результатов гистологии (Таблица 4.2).

При минимальной продолжительности стимуляции сперматогенеза у двух мужчин 28 и 30 лет гистологическая картина оказалась сходной – сочетание гиалинизации семенных канальцев и остановки развития зародышевых клеток на стадии сперматоцитов 1 порядка. В остальных гистологических образцах (за исключением случая результативной пункции) гомогенная картина семенных канальцев соответствовала двум баллам по шкале Johnsen S.G. (в модификации 2014 г.).

Таблица 4.2 — Сопоставление исходов микро-ТЕСЕ у мужчин с немозаичной формой СК с различными факторами

Возраст	SRR *	Терапия	Период лечения до операции	Общая картина	Морфология по McLachlan R.	Морфология по Johnsen S.G.
15	Да	Прегнил 1500Ед 2р в нед	7 мес	Гомогенная	Сертоли-клеточный синдром (СКС) **	1.основная -1-2бал**
22	Да	Прегнил 1500 Ед 2р в нед	5 мес	Гетерогенная	Гипосперматогенез	1.основная -1-2бал; 2. много с/к с ранними сперматидами - 7 баллов; 3.единичные с/к с зрел сперм – 9 балл
16	Нет	Прегнил 1500 Ед 2р в нед	8 мес	гомогенная	СКС + остановка развития	1.основная –1 балл 2. единичные сперматоциты -3 балла
28	Нет	Анастрозол 1 мг 1 р в день	9 мес	гомогенная	Гиалинизация семенных канальцев +СКС	1.основная -1 балл 2. единичные с/к с СКС – 2 балла
28	Нет	Анастрозол 1 мг 1р в день+ Прегнил 1500 Ед 2 р в нед	3 мес	гетерогенная	Гиалинизация семенных канальцев +остановка развития зародышевых клеток	1.основная -1 балл 2. единичные с/к сперматогонии и сперматоциты 1 порядка – 4 балла
30	Нет	Анастрозол 1 мг 1 р в день	1,5 мес иотказ	гетерогенная	Гиалинизация семенных канальцев +остановка развития зародышевых клеток	1.основная -1 балл 2. единичные с/к сперматогонии и сперматоциты 1 порядка – 4 балла

Примечание: *SRR – sperm retrieval rate (частота извлечения сперматозоидов)

** При гистологическом исследовании обнаружены только единичные канальцы со сперматогониями (2 балла). Получены единичные сперматозоиды.

Сперматозоиды, пригодные для ИКСИ, были получены в день пункции партнёрши. Было проведено оплодотворение методом ИКСИ 11 зрелых ооцитов (стадия МП). На следующие сутки получено 10 зигот. Культивирование эмбрионов осуществлялось в мультигазовом инкубаторе при: $t - 37^{\circ}\text{C}$; $\text{CO}_2 - 6,0\%$; $\text{O}_2 - 5,0\%$. Уже после первого и второго дробления эмбрионы имели диффузную фрагментацию и неравную величину

бластомеров (Рисунок 4.3 (2a и 2b)). На третьи сутки эмбрионы отставали в развитии и не имели восьми клеточного набора бластомеров. Степень фрагментации у некоторых эмбрионов достигала 50% объема (Рисунок 4.3 (3a и 3b)). Тенденция запаздывания отмечена и на четвертые сутки развития. У единичных эмбрионов имело место только начало компактизации (Рисунок 4.3 (4a и 4b)), а стадия морулы отсутствовала.

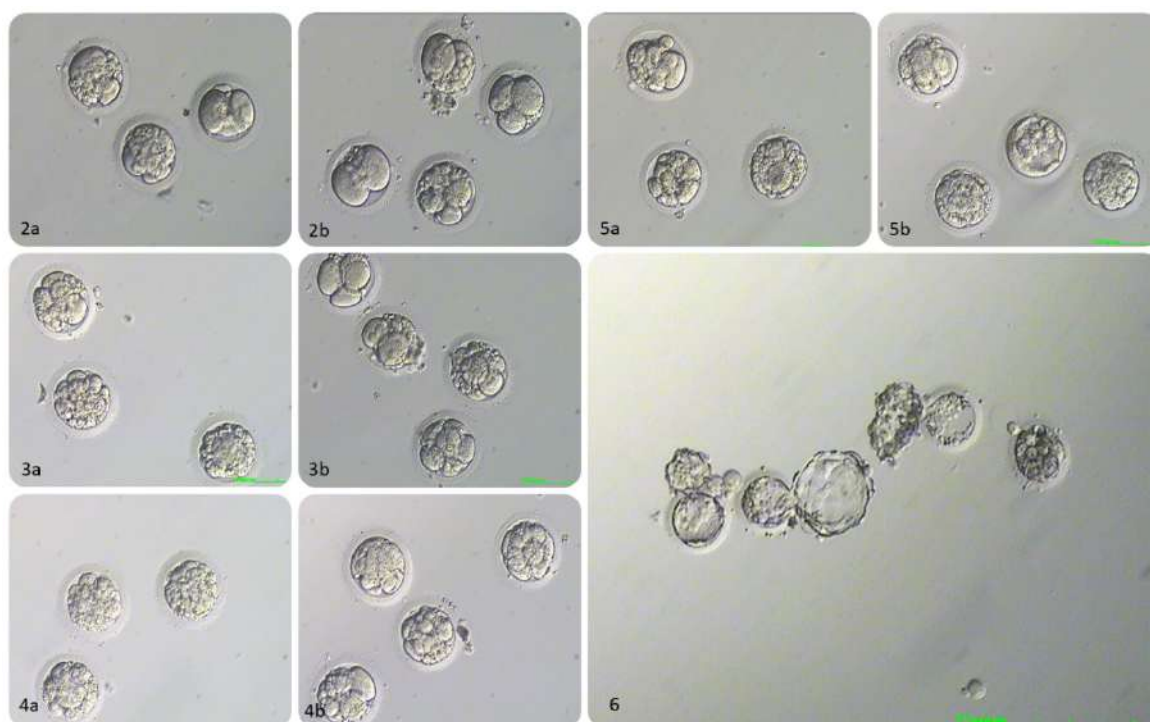


Рисунок 4.3 — Дробление эмбрионов и образование бластоцист

(2a и 2b)- 2 сутки эмбриогенеза

(3a и 3b)-3 сутки эмбриогенеза

(4a и 4b)- 4 сутки эмбриогенеза

(5a и 25b)-5 сутки эмбриогенеза

6 сутки эмбриогенеза Поздние вылупляющиеся бластоцисты до ПГД. Вылупление происходит через созданные отверстия в прозрачной оболочке.

На пятые сутки развития четыре эмбриона достигли стадии морулы, у одной из которых началась кавитация (Рисунок 4.3 (5a и 5b)). Морулы не имели тотальной компактизации клеток и демонстрировали инвагинации. Проведение преимплантационной диагностики было отложено на сутки. На шестые сутки культивирования эмбрионов из четырех морул образовалось три бластоцисты категорий 5BB, 5BB, 6BB (по Гарднеру).

Для определения риска передачи хромосомных аномалий была проведена лазерная биопсия клеток трофэктодермы (Рисунок 4.4).

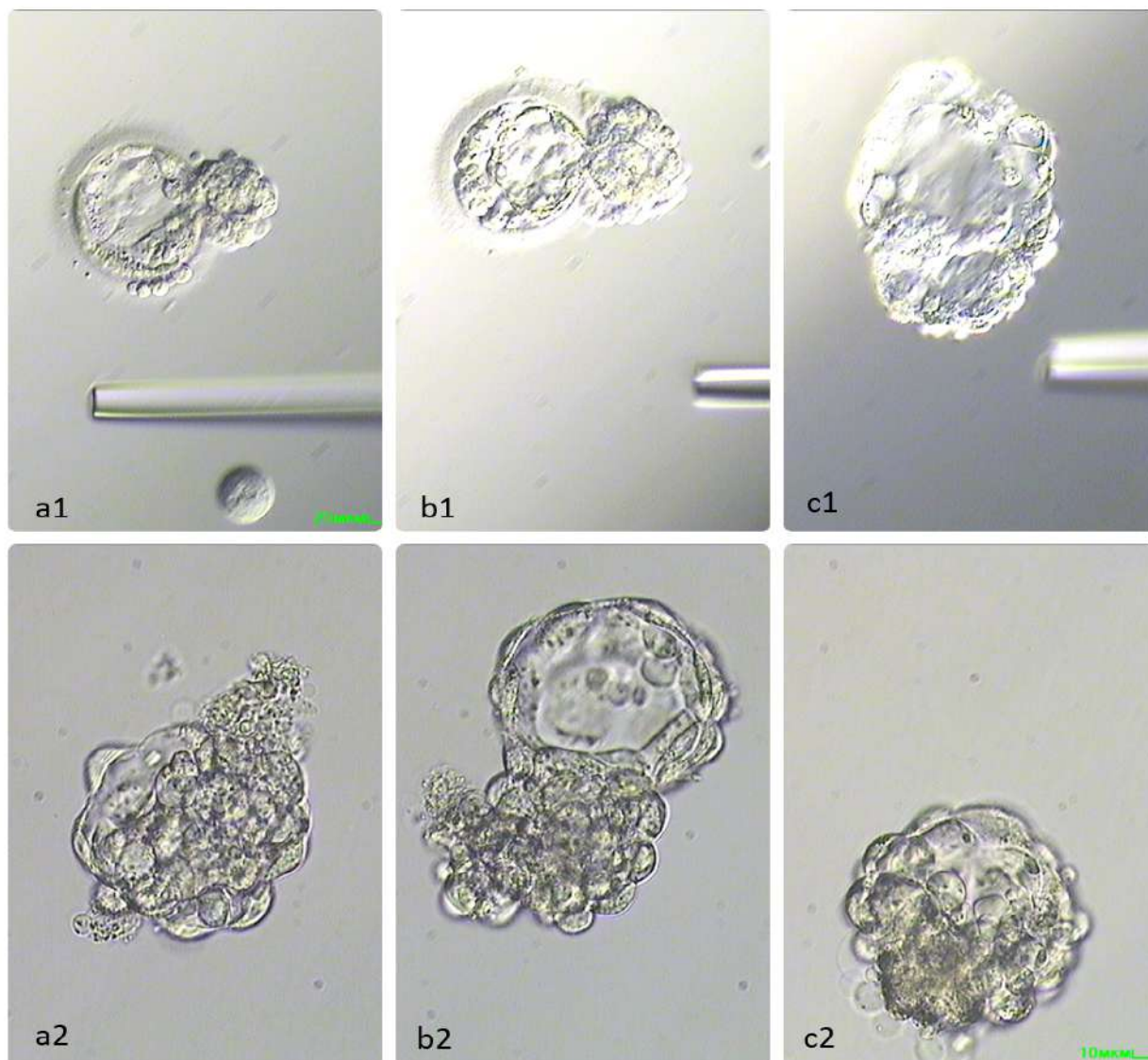


Рисунок 4.4 — Биопсия бластоцист

a1- эмбрион 1 до биопсии, a2- эмбрион 1 после биопсии
 b1 – эмбрион 2 до биопсии, b2- эмбрион 2 после биопсии
 c1 эмбрион 3 до биопсии, c2- эмбрион 3 после биопсии

Такая биопсия позволяет уменьшить механическое воздействие на эмбрион и провести процедуру максимально быстро и точно. После биопсии эмбрионы 1,2,3 были витрифицированы.

С полученными клетками трофэктодермы проведена ПГД на основе платформы секвенирования следующего поколения (метод NGS, Next Generations Sequencing)(Таблица 4.3; Рисунок 4.5-4.7).

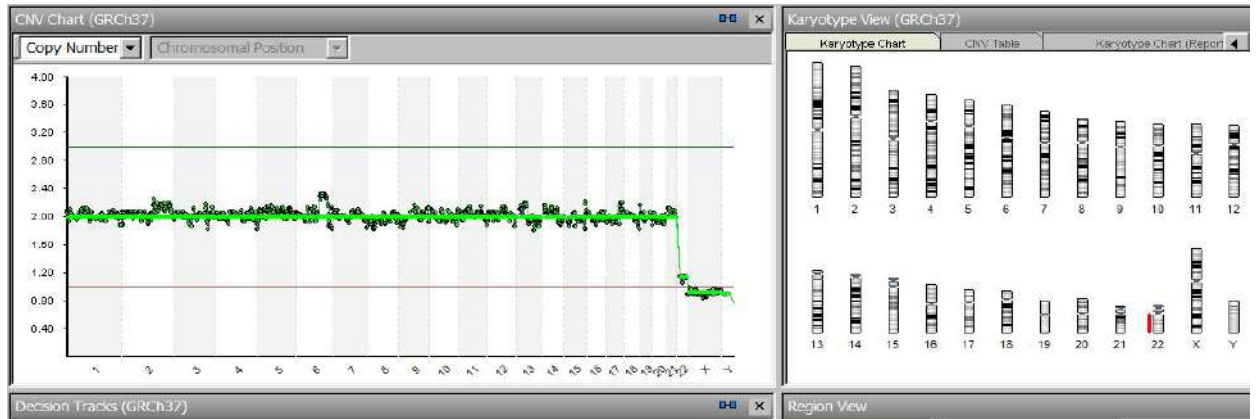


Рисунок 4.5 — Эмбрион 1. Моносомия по 22 хромосоме

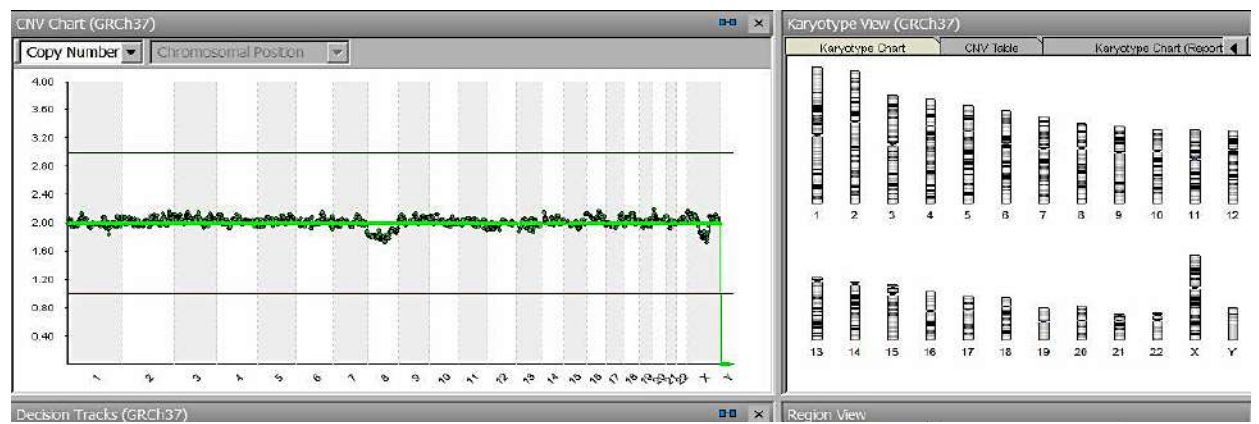


Рисунок 4.6 — Эмбрион 2. Мозаицизм по 8 хромосоме

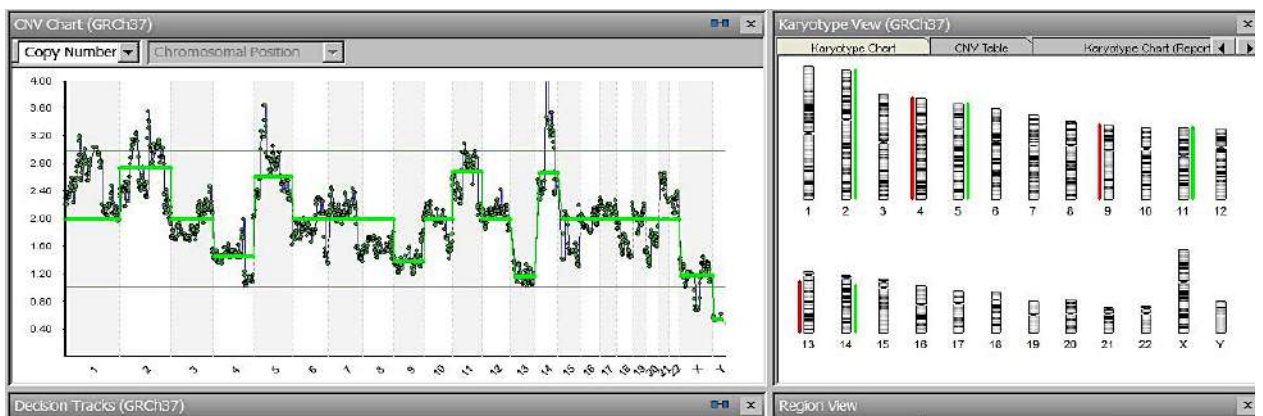


Рисунок 4.7 — Эмбрион 3. Хаотичный набор хромосом

Таблица 4.3 — Результаты исследования хромосомного набора эмбрионов методом NGS (*Next Generation Sequencing*) (с использованием прибора MiSeq illumine)

N эмбриона	Результат секвенирования	Заключение
1	Seq(22)x1,(XY)x1	Выявлена недостача генетического материала, соответствующего хромосоме 22. Аномалий числа половых хромосом не обнаружено.
2	Seq(8)x1~2,(X)x2	Результат анализа может предполагать наличие мозаицизма по хромосоме 8. Аномалий числа половых хромосом не обнаружено.
3	Выявлены множественные анеуплоидии	

По итогам исследования клеток трофобластической оболочки, супружеской паре необходима консультация клинического генетика о возможности переноса эмбриона №2, который на данный момент остается витрифицированным.

Резюме

При обследовании мужчин с азооспермией и СК установлено:

- микрохирургический метод извлечения сперматозоидов (микро-ТЕСЕ) является эффективным методом, позволяющим выделять семенные каналцы из фиброзированной ткани яичка и извлекать сперматозоиды (на примере двоих представителей выборки из 6 человек – юноши 15-ти и мужчины 22-х лет);
- при положительном результате микро-ТЕСЕ существенных отличий представителей групп по объему яичек и гормональному статусу от мужчин с отрицательным исходом выявлено не было, за исключением показателя общего тестостерона у мужчины 22 лет. Однако тенденция большей вероятности экстракции сперматозоидов отмечена при наличии уровня общего тестостерона более 8,7 нмоль/л, нормовесности, доперационной гормональной терапии.
- подтверждено наличие в гистологических образцах тестикулярной ткани пациентов с немозаичной формой СК частичной/полной атрофии

извитых семенных канальцев, с утратой сперматогенного эпителия, гиалинизацией канальцев и фиброзом интерстиция;

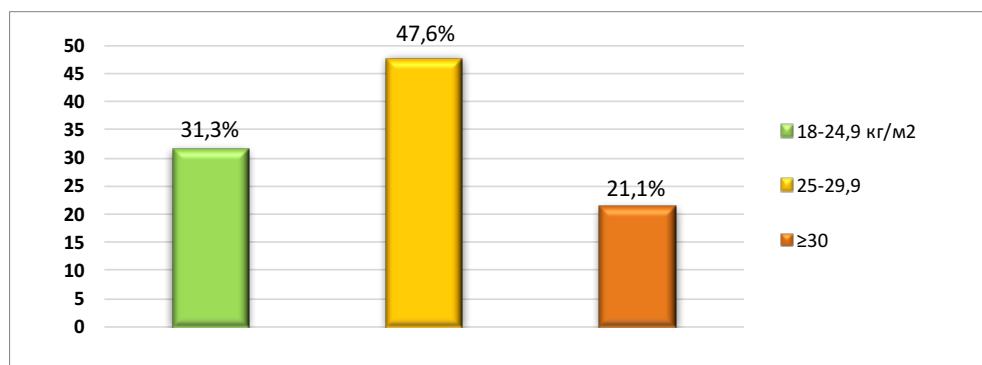
- новизна диагностики – в выявлении единичных сперматозоидов;
- обусловленность анеуплоидии бластоцист по аутосомам соматическими мутациями на ранних стадиях дробления и нерасхождением хромосом во время митоза требует преимплантационной генетической диагностики;
- решение вопроса о переносе мозаичного эмбриона принимается только после консультации с клиническим генетиком.

ГЛАВА 5

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ БЕСПЛОДНЫХ МУЖЧИН С ИЗБЫТОЧНОЙ МАССОЙ ТЕЛА И ОЖИРЕНИЕМ

5.1. Клиническая характеристика нормовесных мужчин, с избыточной массой тела и ожирением

Обследовано 645 бесплодных мужчин в возрасте от 19 до 53 лет, с различным ИМТ (Рисунок 5.1).



$p > 0,05$

Рисунок 5.1— Количество бесплодных мужчин с различным ИМТ в группах

Наибольшее количество мужчин – практически половина вошли в категорию с избыточной массой тела (ИМТ-25-29,9кг/м²), треть оказались нормовесными, каждый пятый (21,1%) имел ожирение.

Данные о средних значениях возраста и веса бесплодных мужчин с различным ИМТ представлены в Таблице 5.1.

Таблица 5.1 — Возраст и длительность бесплодия мужчин с различным ИМТ, Ме (25-75 процентиля)

Группы, ИМТ кг/м ²	N	Возраст (лет)	ИМТ (кг/м ²)	Длительность бесплодия, лет
18 - 24,9	202	35,4 (31,6 -38,3)	23,2 (20,8-24,3)	2,6 (1,9-3,7)
25 - 29,9	307	33,5 (32,8-42,6)	27,7* (25,8-29,3)	3,8 (2,5-4,4)
≥ 30	136	37,3 (34,8-45,4)	32,5* (30,8-35,3)	4,3 (3,5-5,2)
			* <0,001	

Примечание * ($p < 0,001$) – статистическая значимость отличий от группы с ИМТ «18-24,9 кг/м²», Непараметрический U-тест Манна-Уитни.

Средний возраст обследуемых мужчин с различным ИМТ не имел статистически значимых отличий ($p > 0,05$). Длительность бесплодия в парах с наличием у мужчин ожирения составила 4,3 (3,5-5,2) года, 3,8 (2,5-4,4) – при ИзбМТ и 2,6 (1,9-3,7) года – нормовесных.

Анализ ряда социо-эпидемиологических характеристик инфертильных мужчин с различным ИМТ представлен в Таблице 5.2.

Таблица 5.2 — Анамнестические характеристики бесплодных мужчин с различным индексом массы тела

Группы, ИМТ кг/м ²		N	Курение	Злоупотребление алкоголем	ИППП в анамнезе	Эпидемический паротит в анамнезе	Профессиональные вредности
18 - 24,9	абс.	202	25	6	107	13	5
	%		12,4	3,0	53,0	6,4	2,5
25 - 29,9	абс.	307	46	8	155	21	6
	%		15,0	2,6	50,5	6,8	2,0
≥ 30	абс.	136	22	4	77	9	4
	%		16,2	2,9	56,6	6,6	2,9

$p > 0,05$

Частота признаков, традиционно соотносимых с негативным влиянием на реализацию фертильности и состоятельность сперматогенеза, в группах с различными значениями ИМТ оказалась сопоставимой: потребление токсикантов (алкоголь более чем 2-3 раза в неделю – преимущественно пиво), перенесенных ИППП, эпидемического паротита, профессиональных вредностей (контакт с репротоксикантами, работа в горячих цехах).

Исследование липидного профиля бесплодных мужчин с ИзбМТ и ожирением показало тенденцию возрастания фракций, ответственных за атерогенный потенциал крови с наибольшими значениями при ожирении ($p < 0,001$)(Таблица 5.3).

Таблица 5.3 — Параметры липидного обмена бесплодных мужчин с различным ИМТ, Me (25-75 процентиля)

Группы, ИМТ кг/м ²	N	Холестерин, ммоль/л	Холестерин ЛПНП, ммоль/л	Холестерин ЛПВП, ммоль/л	Триглицериды, ммоль/л
18 - 24,9	202	5,0 (4,8-5,3)	2,2 (2,5-2,9)	1,8 (1,4-2,2)	1,0 (0,8-1,1)
25 - 29,9	307	5,8* (5,2-5,6)	3,2* (3,0-3,5)	1,1* (0,8-1,4)	1,7* (1,4-1,9)
≥ 30	136	5,9* (5,5-6,2)	3,8* (3,4-4,1)	1,0* (0,8-1,5)	2,1* (1,8-2,6)
		* <0,001	* <0,001	* <0,001	* <0,001

Примечание * (p<0,001) – статистическая значимость отличий от группы с ИМТ «18-24,9 кг/м²», Непараметрический U-тест Манна-Уитни

Показатели общего ХС, ХС ЛПНП и триглицеридов оказались статистически значимо выше в группе с ожирением (p<0,001), при ИзбМТ – несколько уступали им, однако в сравнении с нормовесными указывали на начальные дислипидемические сдвиги. Прогрессирующее снижение ЛПВП по мере увеличения ИМТ выступало отражением дефицита антиатерогенного пула.

Результаты исследований углеводного обмена представлены в Таблице 5.4.

Таблица 5.4 — Параметры углеводного обмена мужчин с различным ИМТ, Me (25-75 процентиля)

Группы, ИМТ кг/м ²	N	Гликемия натощак, ммоль/л	Инсулин иммунореактивный, ИРИ, МкЕ/мл
18 - 24,9	202	4,6 (4,3-5,2)	10,2 (5,5-15,9)
25 - 29,9	307	4,8 (4,6-5,5)	13,2 (7,0-18,5)
≥30	136	5,0* (4,9-6,0)	13,8* (9,4-23,6)
		* <0,001	* <0,001

Примечание * (p<0,001) – статистическая значимость отличий от группы с ИМТ «18 - 24,9 кг/м²», Непараметрический U-тест Манна-Уитни

Уровень гликемии натощак и инсулина оказались выше у мужчин с ожирением в сравнении с остальными группами ($p < 0,001$).

Анализ влияния избытка массы тела на особенности гормонального фона показал тенденцию к возрастанию уровня эстрадиола ($p < 0,001$) по мере прогрессирования ИМТ – с наибольшими значениями параметров у мужчин с ожирением ($p < 0,001$) (Таблица 5.5).

Таблица 5.5 — Гормональный профиль бесплодных мужчин с различным ИМТ, Ме (25-75 процентиля)

Группы, ИМТ кг/м ²	N	ФСГ, мМЕ/мл	ЛГ, мМЕ/мл	Эстрадиол, пг/мл	Тестостерон общий, нмоль/л	Пролактин, мМЕ/мл
18 - 24,9	202	4,6 (4,3-6,4)	4,8 (4,2-5,6)	52,4 (44,3-65,2)	35,8 (24,6-45,6)	263 (204,3-375,2)
25 - 29,9	307	5,4 (4,3-7,6)	5,4 (4,6-6,5)	88,4* (67,5-105,2)	20,3 (14,7-34,2)	312 (226,3-406,8)
≥30	136	5,6 (4,3-7,2)	6,8 (5,5-7,2)	107,6* (78,3-125,2)	15,8* (12,3-23,5)	375 (254,3-478,2)
				* <0,001	* <0,001	

Примечание * ($p < 0,001$) – статистическая значимость отличий от группы с ИМТ «18 - 24,9 кг/м²», Непараметрический U-тест Манна-Уитни

Содержание Тест_{общ} оказалось наиболее снижено в группе с ожирением ($p < 0,001$), однако его значения не выходили за пределы референсных. Концентрация пролактина в группах с различным ИМТ мужчин варьировала в пределах нормативных показателей.

5.2. Спермиологические характеристики бесплодных мужчин с различным ИМТ

Изучение параметров эякулята в выборке бесплодных мужчин показало снижение его объема с приростом массы тела: показатель при ожирении уступал таковым в остальных группах ($p < 0,05$) (Таблица 5.6).

Таблица 5.6 — Спермиологические характеристики бесплодных мужчин с избытком массы тела, Me (25 и 75 процентиля)

Группы ИМТ, кг/м ²	N	Объем эякулята (норма $\geq 1,5$ мл)	Вязкость (норма < 15 мм)	pH (норма $\geq 7,2$)	Срок разжижения (норма < 60 мин)	Кол-во в 1 мл (норма ≥ 15 млн)	Живые сперматозоиды $\geq 58\%$	Нормальная морфология (норма $\geq 4\%$)	Сумма (a + b) (норма $\geq 40\%$)	Категория «a» (норма $\geq 32\%$)	Категория «b» (норма $\geq 32\%$)	c + d = 50% и менее
18 - 24,9	202	3,7 3,0;4,5	15,0 3,0;20,0	7,7 7,6;7,8	20,0 20,0;20,0	56,0 31,0;89,0	90,0 85,0;94,0	6,0 3,0;11,0	56,5 38,0;70,0	16,0 5,0;25,0	37,0 26,0;46,0	33,0 22,0;49,0
25 - 29,9	307	3,0 2,5;4,5*	15,0 3,0;20,0	7,8 7,6;7,8	20,0 20,0;20,0	48,0 21,0;85,0	90,0 85,0;93,0	6,0 3,0;10,0	52,0 35,0;66,0	15,0 5,0;24,0	33,0 22,0;46,0	36,0 23,0;49,0
≥ 30	136	2,9 2,6;4,2*	20,0 3,0;20,0	7,8 7,7;7,8	20,0 20,0;20,0	45,0 15,0;78,5*	89,0 81,5;93,0	6,0 2,5;10,0	52,0 34,5;65,0	14,0 0,0;21,0	34,0 22,0;44,5	37,5 25,5;55,0*
		* 0,049				* 0,02						* $< 0,001$

Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ИМТ «18 - 24,9 кг/м²», Непараметрический U-тест Манна-Уитни

Вязкость эякулята превышала нормативный показатель с максимальным значением при ожирении, однако статистически значимые отличия отсутствовали. Средние значения pH и срока разжижения эякулята варьировали в пределах нормативных (ВОЗ, 2010), независимо от ИМТ представителей выборки. Среднее число сперматозоидов в 1 мл эякулята во всех группах соответствовало нормативным показателям (ВОЗ, 2010). Отмечена отрицательная корреляция по Спирмену концентрации сперматозоидов с возрастанием ИМТ: статистически значимо меньшее количество гамет в 1 мл эякулята в сравнении с остальными группами наблюдали у представителей с ожирением (коэффициент корреляции $r=-0,36$, $p < 0,001$).

Количество живых сперматозоидов в эякуляте находилось в пределах референсных значений у всех мужчин и не зависело от ИМТ. Наибольшее число гамет с нормальной морфологией выявлено у нормовесных представителей, с наиболее низким значением показателя у мужчин с ожирением. Содержание гамет с наиболее высоким значением быстрой подвижности преобладало в группе с ИМТ, соответствующим нормальной массе тела, и снижалось по мере его возрастания более 25 кг/м^2 . В группе с ожирением отмечали наименьшую встречаемость переменной «а» наряду с превалированием категории «с+d» ($p < 0,001$). Суммарный показатель быстрой и медленной поступательной подвижности сперматозоидов («а+b») оказался в норме во всех группах.

5.2.1 Влияние ИМТ на ультраструктуры сперматозоидов

Оценить влияние ИМТ бесплодных мужчин на патологию головки, шейки, средней части сперматозоидов и жгутика представляется возможным, исходя из данных Таблицы 5.7.

Количество сперматозоидов с удлинёнными головками при ожирении статистически значимо превосходило показатель представителей остальных групп – нормовесных и с ИзбМТ ($p < 0,05$).

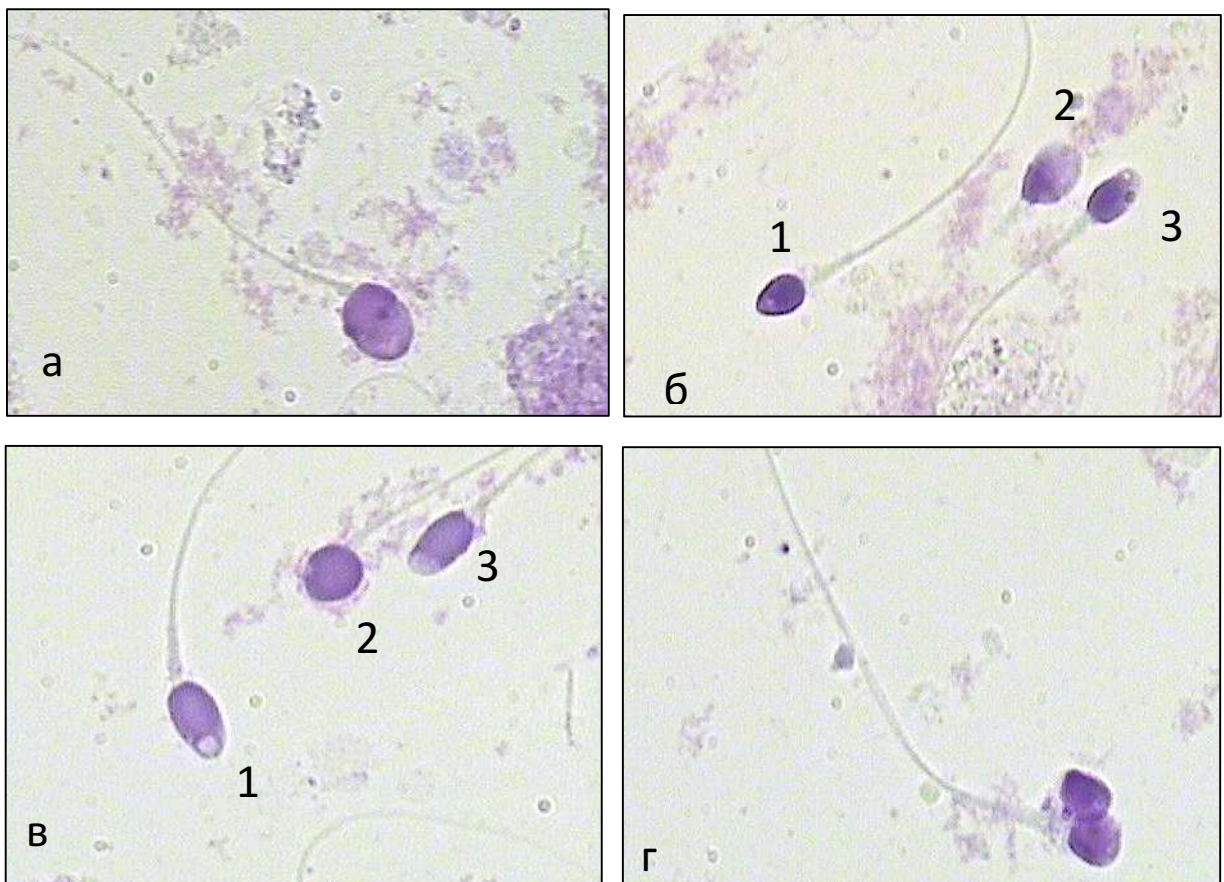
Таблица 5.7 — Структурные особенности сперматозоидов в зависимости от ИМТ бесплодных мужчин, Ме (25 и 75 перцентили)

Группы, ИМТ кг/м ²	N	головки сперматозоидов								шейки, средней части и жгутика			
		Аморфные головки	Вакуоли в головке	Круглые головки	Нарушения в акросоме	Удлиненные головки	Капля на головке	Двухголовые	Микроголовки	Капля на шейке	Нарушения в шейке	Ацефалические сперматозоиды	Атипия жгутика
18 - 24,9	202	26,0 22,0-31,0	6,0 4,0-9,0	4,0 0,0-6,0	8,0 6,0-10,0	3,0 0,0-7,0	0,0 0,0-4,0	0,0 0,0-2,0	3,0 0,0-6,0	13,0 10,0-17,0	16,0 14,0-19,0	2,0 0,0-4,0	5,0 3,0-8,0
25 - 29,9	307	25,0 20,0-30,0	6,0 3,0-8,0	3,0 0,0-5,0	8,0 5,0-10,0	5,0 0,0-8,0*	0,0 0,0-4,0	0,0 0,0-1,0	3,0 0,0-7,0	13,0 10,0-16,0	17,0 15,0-20,0*	2,0 0,0-3,0	5,0 3,0-8,0
≥30	136	23,0 19,0-29,0*	6,0 2,0-9,0	2,0 0,0-6,0	7,0 5,0-10,0	5,0 0,0-9,0*	0,0 0,0-3,0	0,0 0,0-2,0	3,5 0,0-8,0	14,0 10,0-17,0	18,0 15,0-20,0*	1,0 0,0-3,0	5,0 3,0-8,0
						* 0,025					* 0,007		
		* 0,04				* 0,02					* 0,009		

Примечание * (p < 0,05) – статистическая значимость отличий от группы с ИМТ «18 - 24,9 кг/м²», Непараметрический U-тест Манна-Уитни

Сперматозоиды с аморфными головками встречались практически у четверти представителей всех бесплодных мужчин, однако корреляции с ИзбМТ выявлено не было. Остальные варианты структурной патологии головки – вакуолизированные, круглые, с акросомальными нарушениями выявлялись значительно реже – в пределах 4-8%, без статистически значимых отличий по группам. Незначительной оказалась частота сперматозоидов с каплей на головке – с разбросом по группам в 1,8-2,0%, вдвое чаще обнаруживали гаметы с микроголовками – 3,9-4,0%. Прослеживалась тенденция к возрастанию встречаемости двухголовых сперматозоидов у мужчин с ожирением, однако их частота в структуре аномалий строения головки гамет была наименьшей.

При градации форм головки сперматозоидов обращает внимание следующее: после доминантной аморфной структуры практически с равной частотой встречались гаметы с деформациями за счет вакуолей и акросомальных нарушений (Рисунок 5.2).



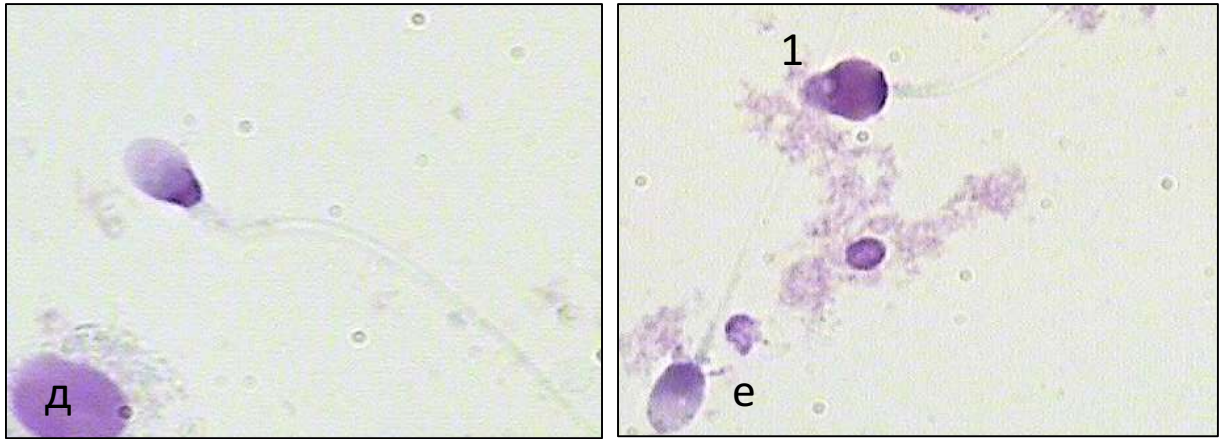


Рисунок 5.2 — Варианты структурной патологии головки сперматозоидов.
 а – макроголовка; б1- микроголовка, б2 – нормальная головка, б3 –нарушение акросомы; в1 –
 вакуоль в акросомальной части головки, в2 –круглая головка, в3 – нормальная форма
 головки и уменьшенная акросома; г – двухголовый сперматозоид; д –увеличенная акросома;
 е1 – аморфная головка.

Гетерогенность морфологических изменений гамет представлена на
 Рисунках 5.3,5.4.

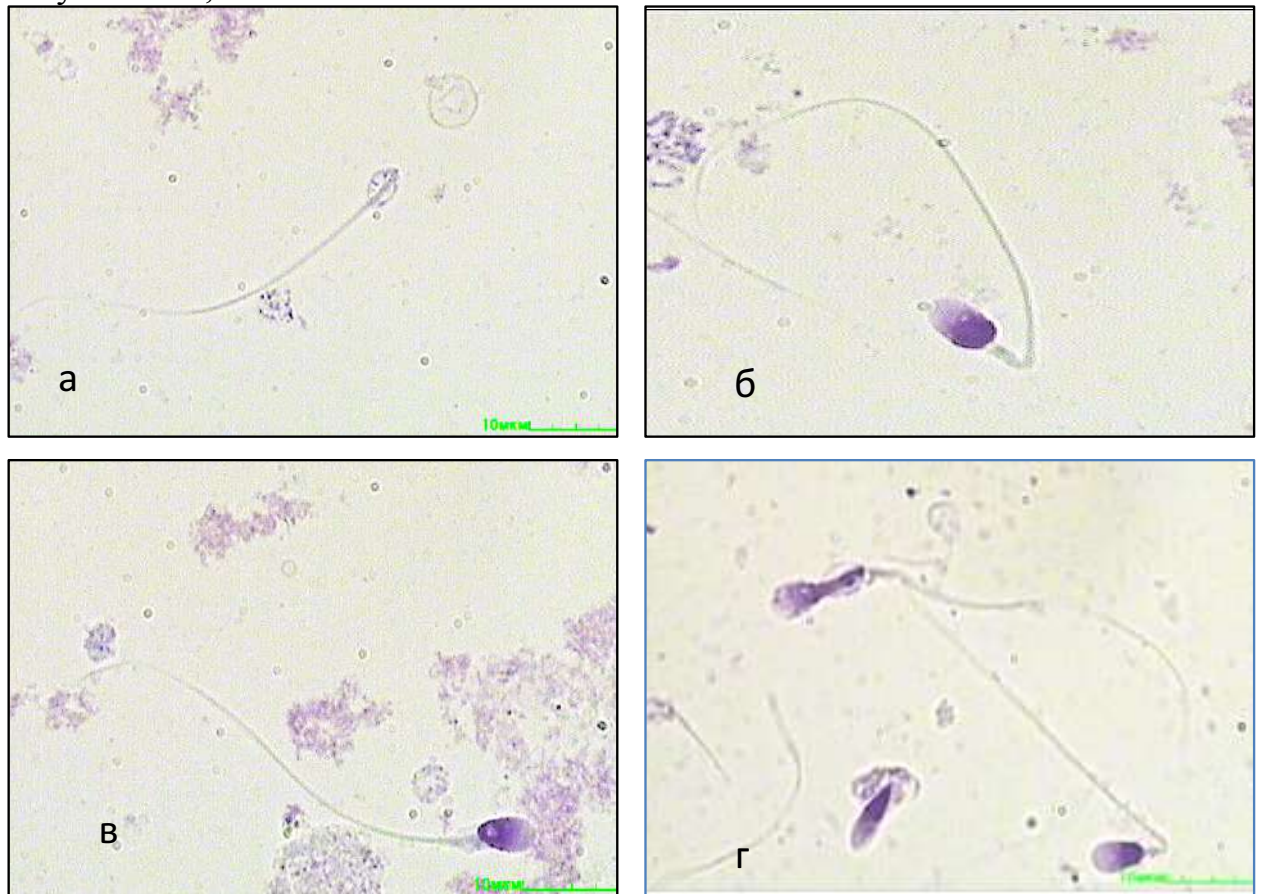


Рисунок 5.3 — а – ацефалический; б – гетероаксиллярность; в - ассиметричное прикрепление
 к головке; г – множественные морфологические изменения: гетероаксиллярность, удлиненная
 головка и скрученный жгутик, грушевидная форма головки

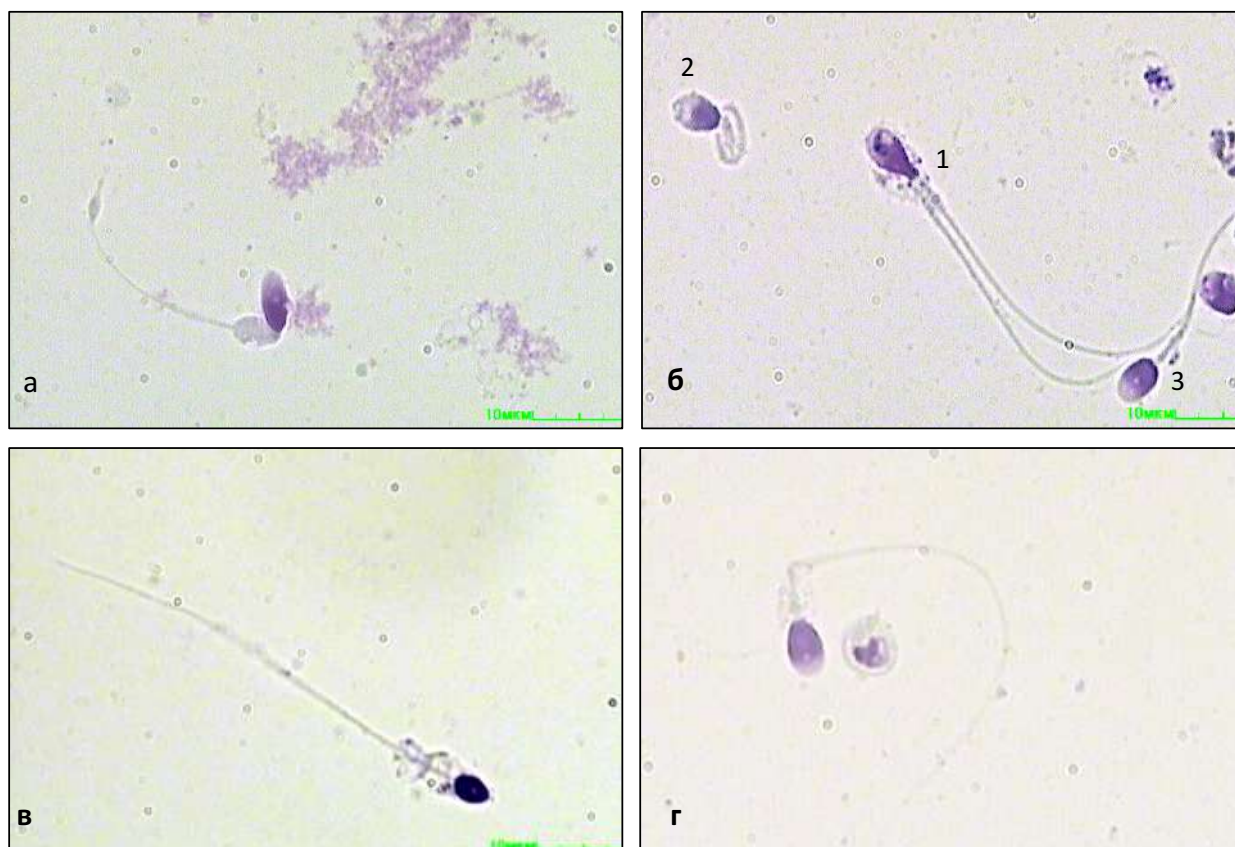


Рисунок 5.4 — Патология головки, шейки и жгутика.

а - удлиненная головка, гетероаксиллярность, резидуальная капля на шейке;

б1 - двойной жгутик, аморфная головка и крупная вакуоль в аксомальной части, б2 - круглая головка, скрученный жгутик, б3 - вакуоль в постакрсомальной части;

в - микроголовка и резидуальная капля на шейке, г - гетероаксиллярность и вакуоль в постакрсомальной части

Количество сперматозоидов с нарушениями в шейке у мужчин с ожирением статистически значимо превосходило аналогичное нормовесных ($p=0,007$ и $p=0,009$ – при ИзбМТ и ожирении соответственно). Ацефалические сперматозоиды, гаметы с каплей на шейке и атипией жгутика в группах мужчин с infertility встречались с равной частотой.

Показатели индекса тератозооспермии (ИТ) в группах бесплодных мужчин были сопоставимы, независимо от ИМТ (Рисунок 5.5).

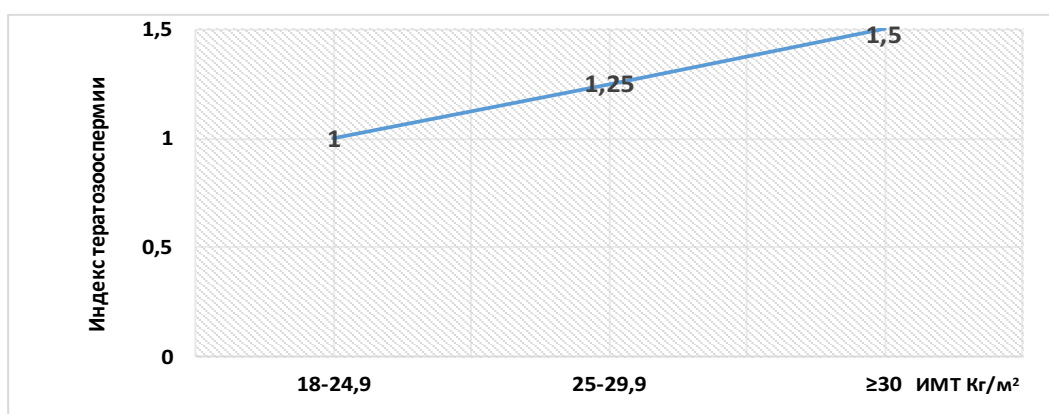


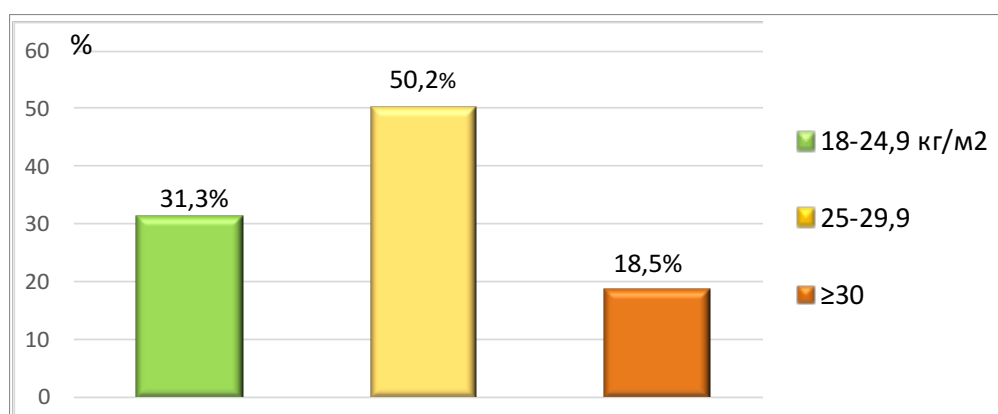
Рисунок 5.5 — Индекс тератозооспермии, $p > 0,05$ ($n=485$)

Определен ряд корреляционных взаимоотношений ИТ: с уровнями ТГ ($r=0,54$, $p < 0,001$ соответственно) и отрицательно – с концентрацией ЛПВП ($r=-0,53$, $p < 0,001$).

5.3. Результаты исследования фрагментации ДНК сперматозоидов у бесплодных мужчин с различным индексом массы тела

Повышенный уровень фрагментации ДНК сперматозоидов выступает одной из наиболее сложно преодолимых форм МБ.

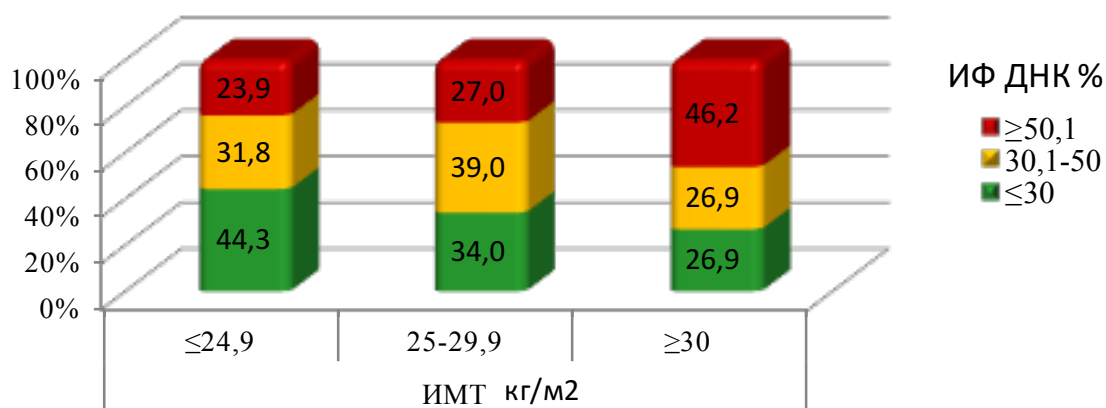
Исследование ИФ ДНК сперматозоидов проведено у 281 мужчины (произвольный отбор): практически трети (31,3%) – нормовесных, половины (50,2%) - с ИзбМТ и 18,5% - с ожирением (Рисунок 5.6).



$p > 0,05$

Рисунок 5.6 — Распределение бесплодных мужчин из выборки обследуемых по ИФ ДНК в зависимости от ИМТ ($n=281$).

Вариабельность ИФ ДНК сперматозоидов в зависимости от ИМТ представлена на Рисунке 5.7.



$p > 0,05$

Рисунок 5.7 — Показатели ИФ ДНК сперматозоидов в группах бесплодных мужчин с различным ИМТ (n=281).

Установлено, что в группе нормовесных мужчин частота нормального ИФ ($\leq 30\%$) составила 44,3%, при ИзбМТ – у 34%, ожирении – четверти (26,9%). Показатели ИФ ДНК в интервале от «30,1% до 50%» были обнаружены: в группах нормовесных и с ИзбМТ – у 36,5% мужчин, 26,9% – с ожирением, однако без статистически значимых отличий.

Наибольший ИФ ДНК – «более 50%» выявлен у мужчин с ожирением (46,2%) – практически в полтора раза чаще, чем в сравнении с показателями остальных групп (26,9% в среднем). Установлены следующие корреляционные связи ИФ с рядом параметров липидограммы: уровнем ТГ ($r=0,36$, $p<0,001$) и ЛПВП ($r=-0,4$, $p<0,001$).

5.4. Функциональная зрелость сперматозоидов при первичной оценке эякулята у бесплодных мужчин с различным ИМТ

Обследовано 195 бесплодных мужчин: 99 – с нормозооспермией и 86 – патозооспермией (пришедшие на повторную консультацию, либо вступившие в протокол ЭКО). В зависимости от ИМТ выделяли: в группе с нормозооспермией – 74 нормовесных, 25 – с ИМТ > 25 (19 – с ИзбМТ, 6 – ожирением), патозооспермией – 25 – нормовесных, 45 – с ИзбМТ, 16 – ожирением.

Средний возраст мужчин в группах с нормо- и патозооспермией статистически значимо не отличался, при несколько большем показателе в группе с ИМТ более 30 кг/м² (Таблица 5.8).

Таблица 5.8 — Характеристики мужчин с различным ИМТ

Группы, ИМТ кг/м ²		N	Возраст	ИМТ
Нормозооспермия	18 - 24,9	74	34,6±1,3	22,4±1,8
	25-29,9	19	36,6±2,4	27,6±2,2
	>30	6	35,8±3,8	31,8±0,9
Патозооспермия	18 - 24,9	25	32,6±2,6	23,1±1,4
	25-29,9	45	32,3±3,4	28,6±1,8
	>30	16	35,5±2,5*	32,4±1,3
			* <0,001	

Примечание *($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с нормозооспермией и соответствующим ИМТ, (параметрический метод Стьюдента-Ньюмана-Кейлса и Краскала-Уоллиса)

Среднее количество сперматозоидов в 1 мл эякулята у нормовесных мужчин, независимо от результатов семиологического исследования, статистически значимо не отличалось. В группах с ИМТ > 25 кг/м² у представителей с патозооспермией количественные характеристики были снижены в сравнении с нормозооспермией – при ИзбМТ и ожирении ($p < 0,05$) (Таблица 5.9).

Таблица 5.9 — Характеристики спермограмм обследованных мужчин

Группы, ИМТ кг/м ²		N	Среднее количество сперматозоидов в 1 мл эякулята	Подвижность сперматозоидов
Нормозооспермия	18 - 24,9	74	78,7±6,8	57,4±2,5
	25 - 29,9	19	72,5±6,5	54,5±2,6
	>30	6	66,7±5,2	47,6±3,8
Патозооспермия	18 - 24,9	25	64,8±5,4	52,4±6,2
	25 - 29,9	45	55,3±4,6*	46,4±4,8*
	>30	16	36,5±6,4*	32,4±5,3*
			* <0,001	* <0,001
			* <0,001	* <0,001

Примечание *($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с нормозооспермией и соответствующим ИМТ, (параметрический метод Стьюдента-Ньюмана-Кейлса и Краскала-Уоллиса)

Аналогичная тенденция была отмечена в отношении подвижности сперматозоидов, наименьшие показатели которой имели место в группах

патозооспермии с ИзбМТ и ожирением – в сравнении со значениями нормовесных мужчин при нормозооспермии ($p < 0,05$).

При анализе результатов НВА-тестирования статистически значимые различия варьировали в зависимости от ИМТ, причем у мужчин с патозооспермией количество гиалуронан-связанных сперматозоидов оказалось снижено в большей степени, чем в группе мужчин с нормозооспермией ($p < 0,05$) (Таблица 5.10).

Таблица 5.10 — Связывание сперматозоидов с гиалуроновой кислотой

Группы, ИМТ, кг/м ²		n	% связанных сперматозоидов от числа подвижных
Нормозооспермия	18 - 24,9	74	76,3±3,6
	25-29,9	19	74,5±4,3
	>30	6	68,3±3,5
Патозооспермия	18 - 24,9	25	71,2±3,8
	25-29,9	45	60,4±4,5*
	>30	16	54,7±5,6*

Примечание *($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с нормозооспермией и соответствующим ИМТ, (параметрический метод Стьюдента-Ньюмана-Кейлса и Краскала-Уоллиса)

Средние значения НВА-теста позволили установить снижение количества связанных с гиалуроновой кислотой сперматозоидов по мере нарастания избытка массы тела ($p < 0,05$), что может косвенно свидетельствовать о нарушениях процессов ремоделирования рецепторного аппарата сперматозоидов, увеличении ИФ ДНК и риске анеуплоидий у контингента с ИзбМТ и ожирением.

С целью поиска предикторных значений спермограммы, рекомендательно указывающих на целесообразность проведения НВА-теста у бесплодных мужчин перед вступлением пары в программу ЭКО/ИКСИ сформированы группы.

Первую из них составили мужчины с показателями НВА-теста «более и менее 85%», в остальных имела место градация значений показателя связывания с гиалуронатом по «нисходящей» на 5%. Группа со значениями теста «более и менее 50%» была рубежной вследствие малой выборки представителей и невозможностью проведения статистического анализа.

Анализ концентрации сперматозоидов в группах с различным значением НВА-теста показал статистически значимые отличия ($p < 0,05$, $p < 0,01$) концентрации сперматозоидов в 1 мл нативного эякулята (от 35,5% до 49,4%)(Таблица 5.11).

Таблица 5.11— Концентрация сперматозоидов в группах с различным значением НВА теста

НВА	>85	<85	>80	<80	>75	<75	>70	<70
X±m	87,1±9,94	54,0±5,85	82,4±8,13	45,2±5,51	78,1±7,36	44,3±6,20	75,1±6,89	42,6±6,65
%	38%**		45,1%**		43,3%**		43,3%**	
НВА	>65	<65	>60	<60	>55	<55	>50	<50
X±m	72,9±6,50	40,9±7,25	73,3±6,37	37,1±6,46	69,5±6,12	40,6±7,86	67,8±5,85	43,7±10,48
%	43,9%**		49,4%**		41,6%**		35,5%	

Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от групп, ** $p < 0,01$, (параметрический метод Стьюдента-Ньюмана-Кейлса и Краскала-Уоллиса), (n=195)

Выявлено снижение значений концентрации сперматозоидов с 54 млн/мл до 41 млн/мл соответственно – «синхронно» значениям НВА-теста с 85% до <65% (Рисунок 5.8).

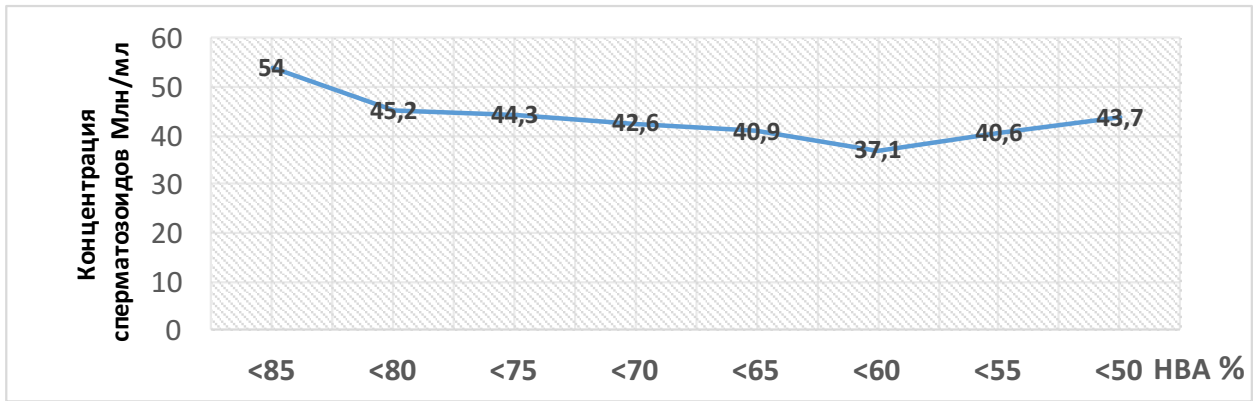


Рисунок 5.8 — Соотношения концентрации сперматозоидов к значениям НВА-теста, (n=195)

Дальнейшее снижение значений НВА-теста не уменьшало концентрацию сперматозоидов.

Коэффициент корреляции (r) был равен 0,325 (при $t=3,03$; $p<0,05$). Следовательно, предикторным значением для рекомендации к проведению НВА-теста можно рассматривать концентрацию сперматозоидов ≤ 41 млн/мл.

Сравнение результатов подвижности сперматозоидов с данными НВА-теста показало статистически значимые отличия в группах с пошаговой градацией разницы в 5% - для всех изучаемых интервалов ($p<0,05$, $p<0,01$); минимальная разница значений по подвижности составила 17,5%, максимальная – 30,6% (Таблица 5.12).

Таблица 5.12 — Прогрессивная подвижность сперматозоидов в группах с различным значением НВА-теста

НВА	>85	<85	>80	<80	>75	<75	>70	<70
$\bar{X} \pm m$	58,1 \pm 2,85	44,2 \pm 2,41	55,2 \pm 2,22	42,2 \pm 3,04	54,2 \pm 2,03	41,2 \pm 3,48	54,6 \pm 1,98	37,9 \pm 3,60
%	23,9%**		23,5%**		24%**		30,6%**	
НВА	>65	<65	>60	<60	>55	<55	>50	<50
$\bar{X} \pm m$	52,9 \pm 2,12	38,3 \pm 3,85	52,3 \pm 2,15	38,5 \pm 3,93	50,4 \pm 2,26	41,6 \pm 4,04	50,3 \pm 2,14	37,8 \pm 3,98
%	27,6%**		26,4%**		17,5%		24,9%*	

Примечание * ($p<0,05$) – статистическая значимость отличий от групп, ** $p\leq 0,01$, (параметрический метод Стьюдента-Ньюмана-Кейлса и Краскала-Уоллиса), (n=195).

Выявлено последовательное снижение НВА-теста с 85% до значений <70% и доли прогрессивно-подвижных сперматозоидов с 44% до 38% соответственно (Рисунок 5.9).

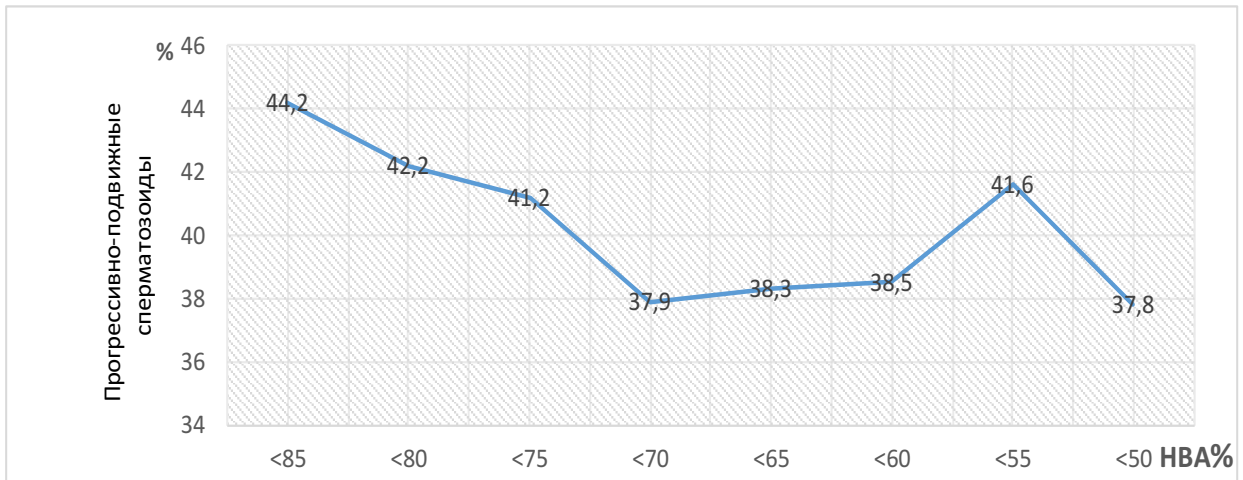


Рисунок 5.9 — Соотношения прогрессивной подвижности сперматозоидов к значениям НВА-теста, (n=195)

Далее на графике отмечается плато со статистически незначимым подъёмом. Степень связи между подвижностью и величиной связывания с гиалуронатом составила 0,332 (при $t=3,1$; $p<0,05$). Следовательно, показанием к выполнению НВА-теста является снижение прогрессивной подвижности сперматозоидов $\leq 38\%$.

Морфологический анализ сперматозоидов в группах с различным значением НВА-теста показал статистически значимые отличия в группах с пошаговой градацией разницы в 5% - для всех изучаемых интервалов ($p<0,05$, $p<0,01$)(Таблица 5.13).

Таблица 5.13 — Морфология сперматозоидов в группах с различным значением НВА-теста

НВА	>85	<85	>80	<80	>75	<75	>70	<70
X±m	7,8±1,19	5,3±0,53	7,6±0,95	4,3±1,06	7,2±0,91	4,3±1,15	7,6±0,98	3,0±0,56
%	32,1%		43,4%*		40,3%		60,1%**	
НВА	>65	<65	>60	<60	>55	<55	>50	<50
X±m	7,1±0,70	3,1±0,48	7,1±0,92	2,8±0,62	6,9±0,92	3,0±0,63	6,7±0,84	2,7±0,27
%	56,3%**		60,6%**		56,5%**		59%**	

Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от групп, ** $p < 0,01$, (параметрический метод Стьюдента-Ньюмана-Кейлса и Краскала-Уоллиса), ($n=195$)

Вариабельность значений исследуемого показателя в данной выборке составила 32,1% - 60,6%.

Установлено снижение значений НВА-теста с 85% до значений <70% и морфологически нормальных сперматозоидов с 5% до 3% соответственно (Рисунок 5.10).

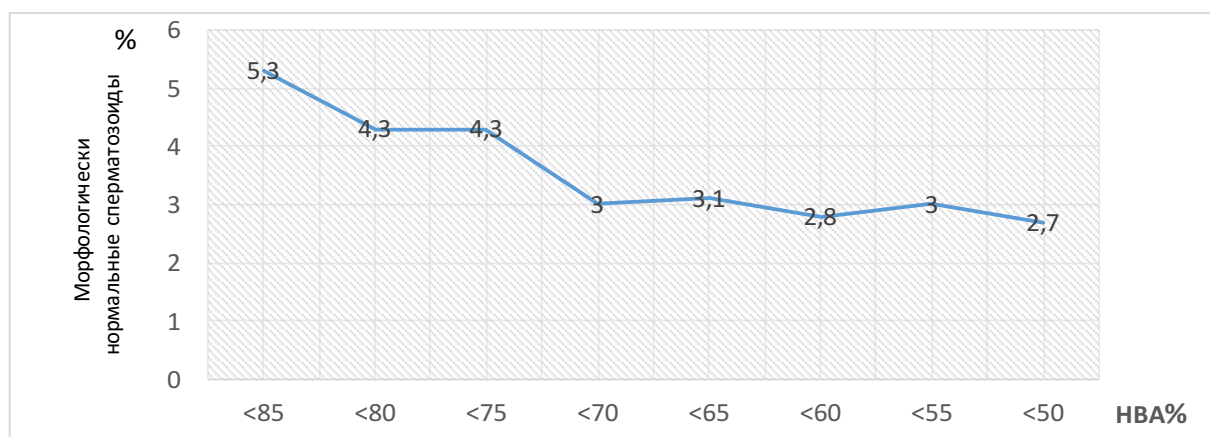


Рисунок 5.10 — Соотношение морфологически нормальных сперматозоидов к значениям НВА-теста, ($n=195$)

Согласно данным, начиная со значения НВА-теста <70%, дальнейшего снижения количества морфологически нормальных сперматозоидов не происходило ($r=0,332$) (при $t=2,66$; $p < 0,05$). Следовательно, предикционным к выполнению НВА-теста следует полагать содержание морфологически нормальных сперматозоидов $\leq 3\%$.

Выявлена умеренная статистически значимая положительная корреляция между значениями НВА-теста и основными показателями спермограммы: концентрацией, подвижностью и морфологией сперматозоидов.

Резюме:

Влияние избытка массы тела на метаболизм мужчин реализовалось в:

- большей частоте гликемии, гиперинсулинемии;
- возрастании атерогенного потенциала крови – содержания общего ХС, ХС ЛПНП и триглицеридов;
- наибольших значениях ФСГ и эстрадиола у мужчин с ожирением, одновременно с более низкими – Тест_{общ.}

Ухудшение спермиологических особенностей бесплодных мужчин наблюдали по мере прироста массы тела за счет:

- снижения объема эякулята, концентрации сперматозоидов в 1 мл, наибольшей частоты гамет категории «с+d» – в группе с ожирением; ухудшения морфологии гамет – за счет фракций с удлинёнными головками, нарушениями в шейке – при ожирении; корреляции структурной патологии гамет с гиперинсулинемией и ТГ;
- высокого показателя ИФ ДНК сперматозоидов (более 50%)(46,2% при ожирении против 26,9% в среднем в остальных группах), его корреляции с маркерами липидного метаболизма (уровнем ТГ и ЛПВП);
- снижения количества гиалуронат-связанных сперматозоидов при патозооспермии – как маркера нарушения рецепторного аппарата сперматозоидов у контингента с ИзбМТ и ожирением.

Определены предикторные значения спермограммы для рекомендации к выполнению НВА-теста до вступления в программы ЭКО/ИКСИ: концентрация сперматозоидов ≤ 41 млн/мл; снижение прогрессивной подвижности сперматозоидов $\leq 38\%$; содержание морфологически нормальных сперматозоидов $\leq 3\%$.

ГЛАВА 6

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ И РЕАБИЛИТАЦИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ МУЖЧИН С ЭНДОКРИНОПАТИЯМИ И ТЯЖЕЛЫМИ НАРУШЕНИЯМИ СПЕРМАТОГЕНЕЗА МЕТОДАМИ ВРТ

6.1. Эффективность лечения различных типов азооспермии

6.1.1. Исходы различных методик получения сперматозоидов у мужчин с азооспермией, эффективность ВРТ

Протоколы ЭКО-ИКСИ в парах с мужским или сочетанным (женским) факторами бесплодия представлены в Таблице 6.1.

Таблица 6.1 — Количество начатых протоколов ЭКО-ИКСИ

Группы			N	«Свежие» протоколы	Крипротоколы	«Свежие» протоколы с размороженными сперматозоидами
Азооспермия обструктивная	микро-ТЕСЕ+МЕСА	абс.	28	16 ∞	4	20 ∞
		%		57,1	14,3	71,4
	ТЕСЕ+ПЕСА	абс.	58	58*	16	0
		%		100,0	27,6	0,0
Азооспермия необструктивная	микро-ТЕСЕ	абс.	112	94	18	3
		%		83,9	16,1	2,7
	ТЕСЕ+ПЕСА	абс.	6	6	0	0
		%		100,0	0,0	0,0
Азооспермия смешанная	микро-ТЕСЕ+МЕСА	абс.	68	64	8	16**
		%		94,1	11,8	23,5
	ТЕСЕ+ПЕСА	абс.	40	36	28	0
		%		90,0	70,0	0,0
				∞ 0,003 *0,014		∞ <0,001
						**<0,001

Примечание * ($p < 0,05$) - статистическая значимость отличий от группы с смешанной азооспермией, ** - группы с НОА, ∞ - всех групп, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Протоколы ЭКО-ИКСИ с нативными сперматозоидами, полученными непосредственно после извлечения, осуществляли: в группе с ОА после ТЕСЕ+ПЕСА практически вдвое чаще, чем микро-ТЕСЕ+МЕСА (100% против 57,1%, $p = 0,003$), 91,9% в среднем – в остальных группах.

Количество «свежих» протоколов ЭКО-ИКСИ со сперматозоидами, экстрагированными в процессе ТЕСЕ+ПЕСА и донорскими (ДС) в группах с ОА и НОА составило 100%, 90% - со смешанной азооспермией. Суммарно циклы ЭКО-ИКСИ с нативными сперматозоидами (мужа (СМ), донора и их сочетанием) несколько преобладали после ТЕСЕ+ПЕСА в сравнении с микро-ТЕСЕ+МЕСА (96,7% против 78,4%). Количество криопротоколов с размороженными эмбрионами, полученными в результате ИКСИ ДС, оказалось больше после ТЕСЕ+ПЕСА: при смешанной азооспермии – более чем в два раза в сравнении с ОА (70% против 27,6%); микро-ТЕСЕ – у 14,1% в среднем. Суммарный показатель протоколов с размороженными после криоконсервации сперматозоидами мужа (или в совокупности с ДС): 71,4% - с ОА ($p < 0,001$), 23,5% - смешанной азооспермией и 2,7% - НОА.

Показатели протоколов со СМ представлены в Таблице 6.2.

Таблица 6.2 — Проведенные циклы ЭКО при положительных результатах извлечений сперматозоидов из ткани яичек и их придатков

Группы			N	«Свежие» протоколы	Отказы от переноса эмбрионов, завершения протоколов	Протоколы переноса размороженных эмбрионов	«Свежие» протоколы с размороженными сперматозоидами
Азооспермия обструктивная	микро-ТЕСЕ+ МЕСА	абс.	28	16	12 ∞	0	16**
		%		57,1	42,9	0,0	57,1
	ТЕСЕ+ ПЕСА	абс.	58	58**	0	16	0
		%		100,0	0,0	27,6	0,0
Азооспермия необструктивная	микро-ТЕСЕ	абс.	112	55	18	8	3
		%		49,1	16,1	7,1	2,7
	ТЕСЕ+ ПЕСА	абс.	6	3	0	0	0
		%		50,0	0,0	0,0	0,0
Азооспермия смешанная	микро-ТЕСЕ+ МЕСА	абс.	68	64 ∞	4	4	16 ∞
		%		94,1	5,9	5,9	23,5
	ТЕСЕ+ ПЕСА	абс.	36	36 ∞	4	24*	0
		%		100,0	10,0	66,7	0,0
				**<0,001	∞ 0,003	*<0,001	**<0,001
				∞ <0,001			
				∞ <0,001			

Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, ** – статистическая значимость отличий от группы с НОА, ∞ - от всех групп, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Извлечение сперматозоидов в процессе микро-ТЕСЕ+МЕСА способствовало проведению циклов с нативными сперматозоидами у 57,1% ($p<0,001$), мужчин с ОА, 71,6% - в остальных группах.

Протоколы с размороженными после криоконсервации сперматозоидами, экстрагированными из гонад с помощью манипуляции микро-ТЕСЕ+МЕСА, выполнены: в 57,1% пар с ОА, 23,5% – смешанной азооспермией и 2,7% – с НОА ($p<0,001$). Перенос замороженных/размороженных эмбрионов, полученных в результате оплодотворения тестикулярными/эпидидимальными сперматозоидами, чаще осуществляли после ТЕСЕ+ПЕСА: при смешанной азооспермии – в 66,7%, ОА – в 27,6% ($p<0,001$), микро-ТЕСЕ – в 6,5% в среднем при НОА и смешанной азооспермии. Отказы от завершения протоколов (переноса эмбрионов (ПЭ)) отмечены только после микро-ТЕСЕ+МЕСА: у 42,9% представителей с ОА, 16,1% – с НОА и только 7,9% - со смешанной азооспермией.

Причины невозможности завершения программы, либо отказов от переноса эмбрионов в «свежих» протоколах ЭКО-ИКСИ в группе с НОА: нежелание воспользоваться донорской спермой (ДС)(55,6%)(44,4% из них закончилось замораживанием ооцитов), синдром гиперстимуляции яичников (27,8%), незаинтересованность в реализации репродуктивной функции в силу возраста (15-16 лет) и прочих обстоятельств (16,7%)(Рисунок 6.1).

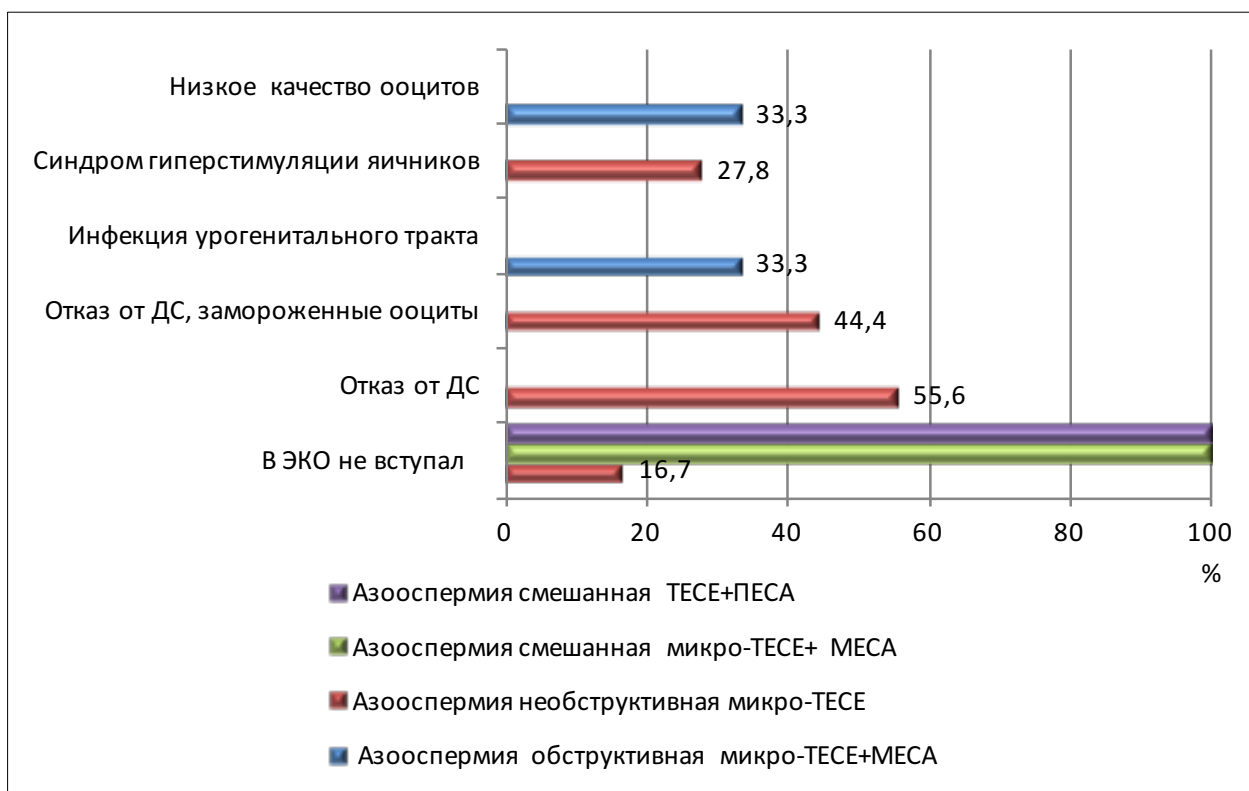


Рисунок 6.1 — Причины отказа от переноса эмбрионов в «свежих» протоколах ЭКО-ИКСИ, $p > 0,05$, (n=38)

При ОА невозможность завершить программу ЭКО-ИКСИ переносом эмбрионов предопределяло наличие инфекции урогенитального тракта мужчины, низкое качество ооцитов и эмбрионов (по 33,3%), смешанной азооспермии – отражали нежелание самих представителей группы.

Структура причин невозможности/отказов от ПЭ в протоколах с нативными и криоконсервированными сперматозоидами отличалась в зависимости от типов азооспермии (Рисунок 6.2).

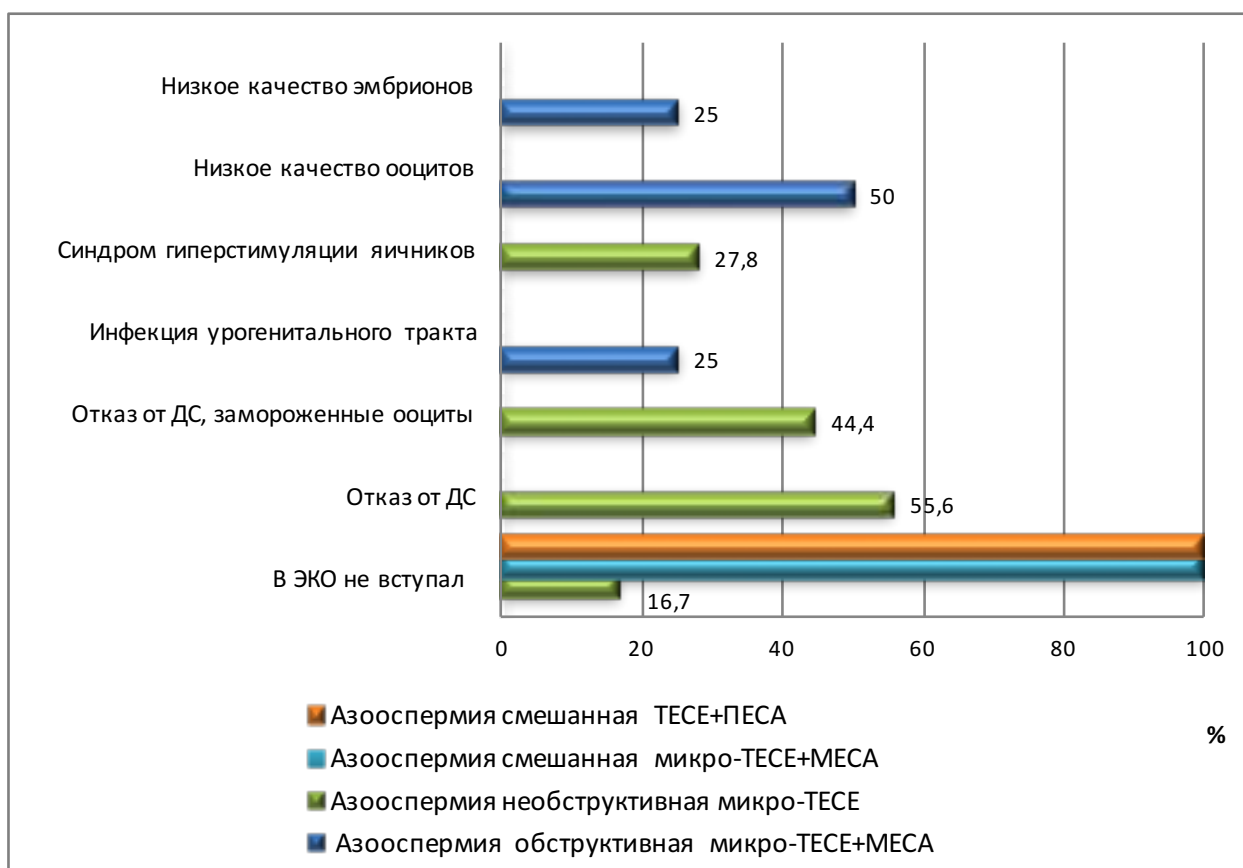


Рисунок 6.2 — Суммарные факторы невозможности/отказов от ПЭ в протоколах ЭКО-ИКСИ, $p > 0,05$, ($n=60$)

В структуре причин невозможности завершения протоколов в группе с НОА более половины случаев составляли отказы от ДС (55,6%), в 27,8% – синдром гиперстимуляции яичников, 16,7% – субъективные факторы, при ОА в группе с микродиссекцией гонад – удельный вес ооцитов низкого качества (50%), эмбрионов и инфекций уrogenитального тракта (по 25%).

Проанализированы виды используемой спермы в протоколах ВРТ.

В «свежих» протоколах для оплодотворения ооцитов партнерши сперматозоиды мужа были задействованы в 96,5% - при ОА, 52,6% - НОА и 94,1% - смешанной азооспермии (Рисунок 6.3).

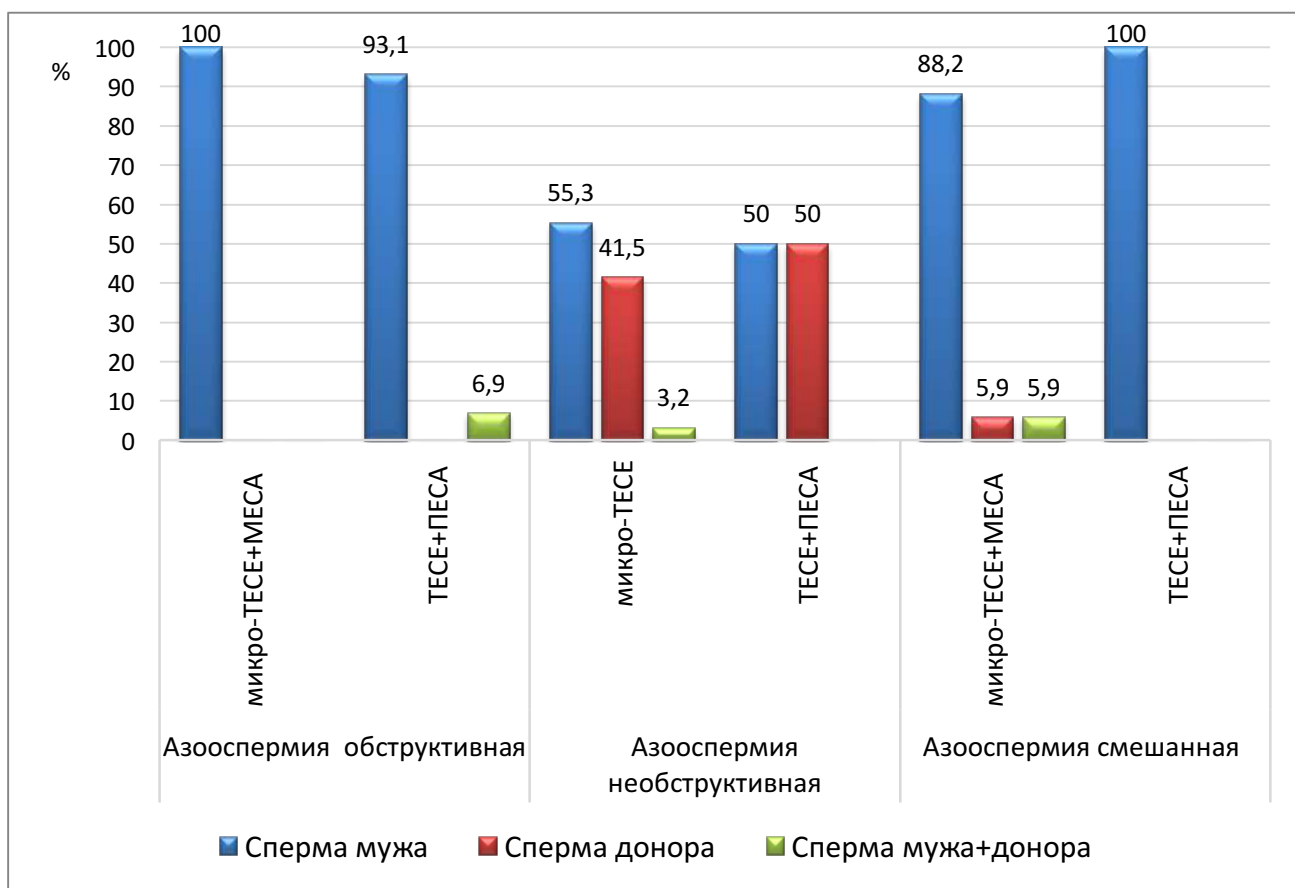


Рисунок 6.3 — Виды используемых сперматозоидов в «свежих» протоколах ЭКО-ИКСИ, $p > 0,05$, (n=268)

ДС в связи с отсутствием сперматозоидов при микрохирургическом извлечении использовали в 45,7% циклов при НОА и 5,9% - смешанной азооспермии. К сочетанному оплодотворению одной части ооцитов сперматозоидами мужа, другой – донора прибегали при нахождении в пунктатах яичек единичных сперматозоидов или их невысоких морфологических характеристиках: в группах с НОА и смешанной азооспермией после микро-ТЕСЕ – у 4,5%, с ОА после ТЕСЕ+ПЕСА – 6,9%.

В протоколах с размороженными сперматозоидами, исходно полученными после микро-ТЕСЕ, гаметы мужа применяли в 50% – при НОА и 78,1% – ОА и смешанной азооспермии (Рисунок 6.4).

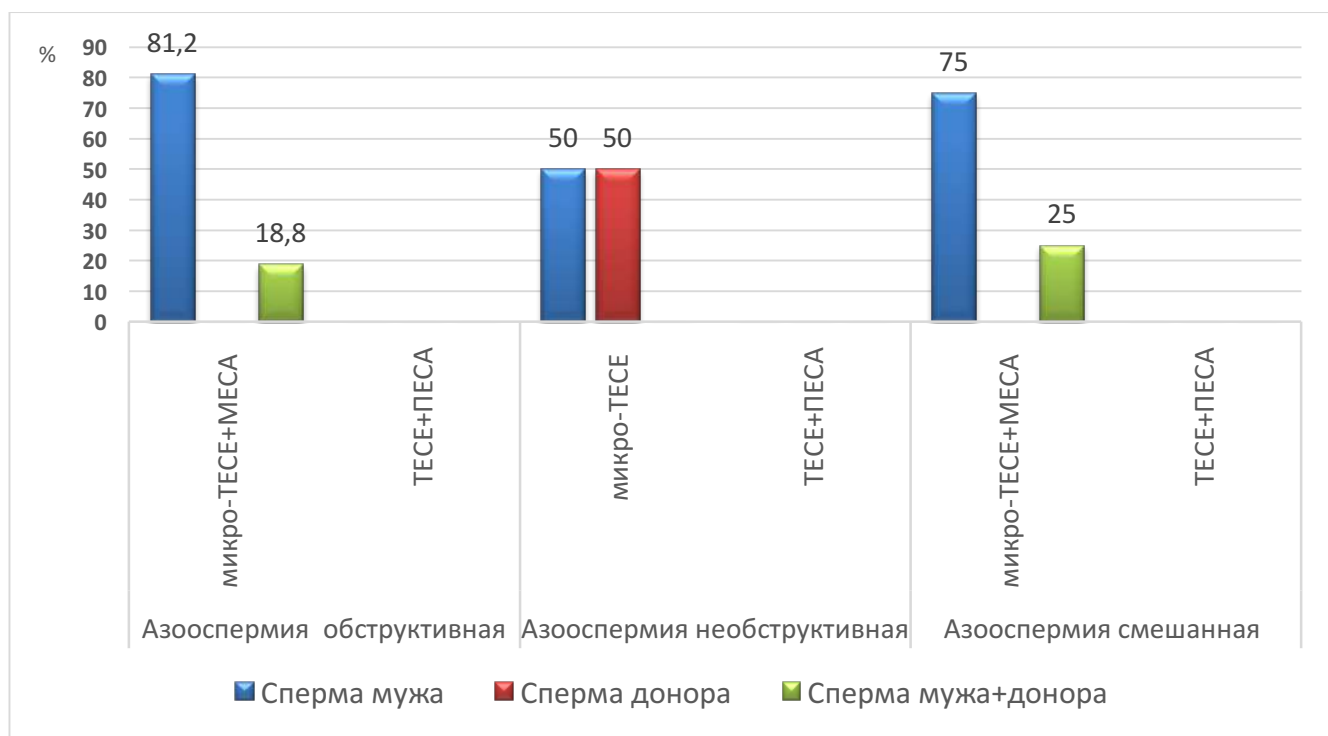


Рисунок 6.4 — Виды сперматозоидов в протоколах ЭКО-ИКСИ с размороженной спермой, $p > 0,05$, ($n=16$)

Неэффективная биопсия яичек и их придатков определила возможность использования ДС в половине циклов ВРТ при НОА.

Сочетание ДС и единичных сперматозоидов мужа с невысокими морфологическими свойствами после микро-ТЕСЕ реализовали в 18,8% протоколов с ОА и 25% - со смешанной азооспермией.

Протоколы с переносом замороженных/размороженных эмбрионов состоялись: в группах после неэффективных микро-ТЕСЕ+МЕСА в 100% (при оплодотворении ДС) и практически вдвое реже (47,2% в среднем) – при НОА и смешанной азооспермии при оплодотворении спермой мужа (Рисунок 6.4).

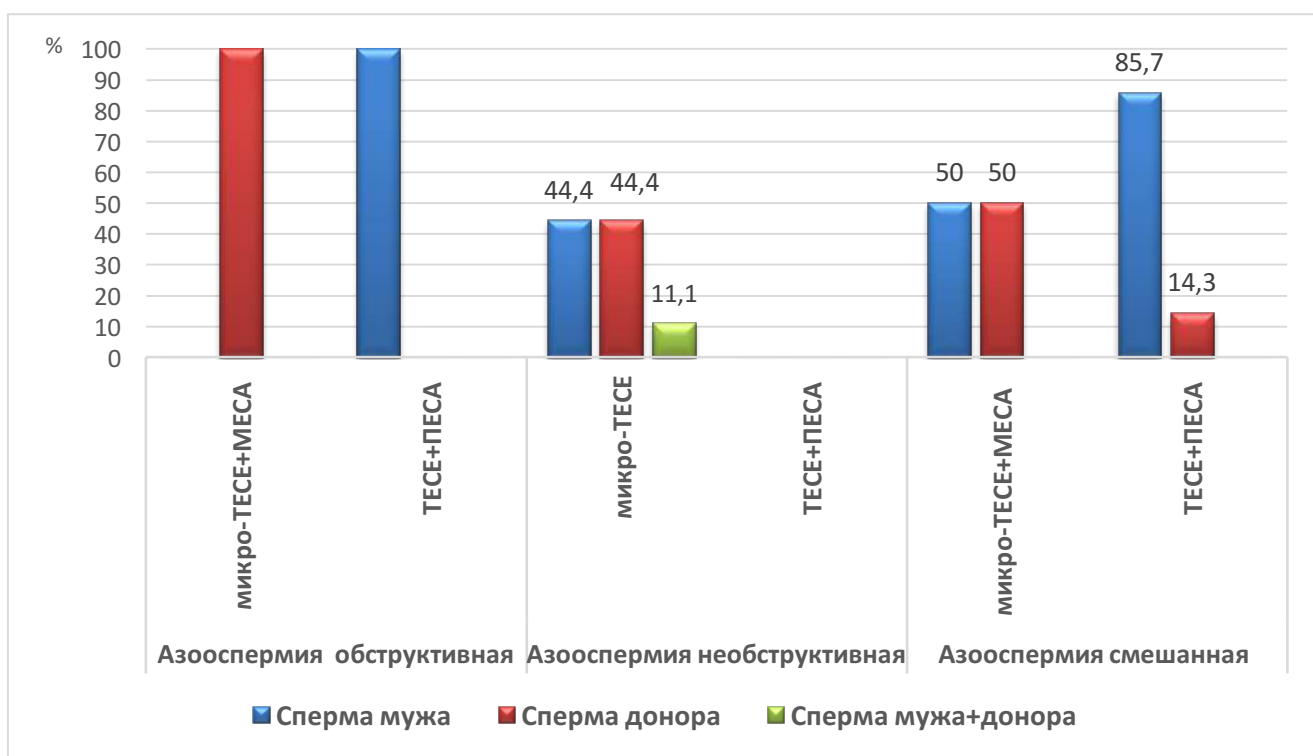


Рисунок 6.4 — Виды сперматозоидов в протоколах с криопереносом эмбрионов, $p > 0,05$, ($n=74$)

Показатель переноса размороженных эмбрионов (после неэффективных манипуляций ТЕСЕ+ПЕСА применяли ДС) составил 14,3% - только в группе со смешанной азооспермией. Криопротоколы с эмбрионами, полученными при использовании спермы мужа и донора – только при НОА (11,1%), мужа – в 92,8% в среднем после ТЕСЕ+ПЕСА при ОА и смешанной азооспермии.

Частота наступления беременности (ЧНБ) в циклах ЭКО-ИКСИ в зависимости от методики обнаружения сперматозоидов: в «свежем» протоколе после ТЕСЕ+ПЕСА – у всех с НОА и 75,6% – в остальных группах; микро-ТЕСЕ+МЕСА – четверти с ОА и в полтора раза чаще (43,3%) – при смешанной азооспермии и НОА (Рисунок 6.5).

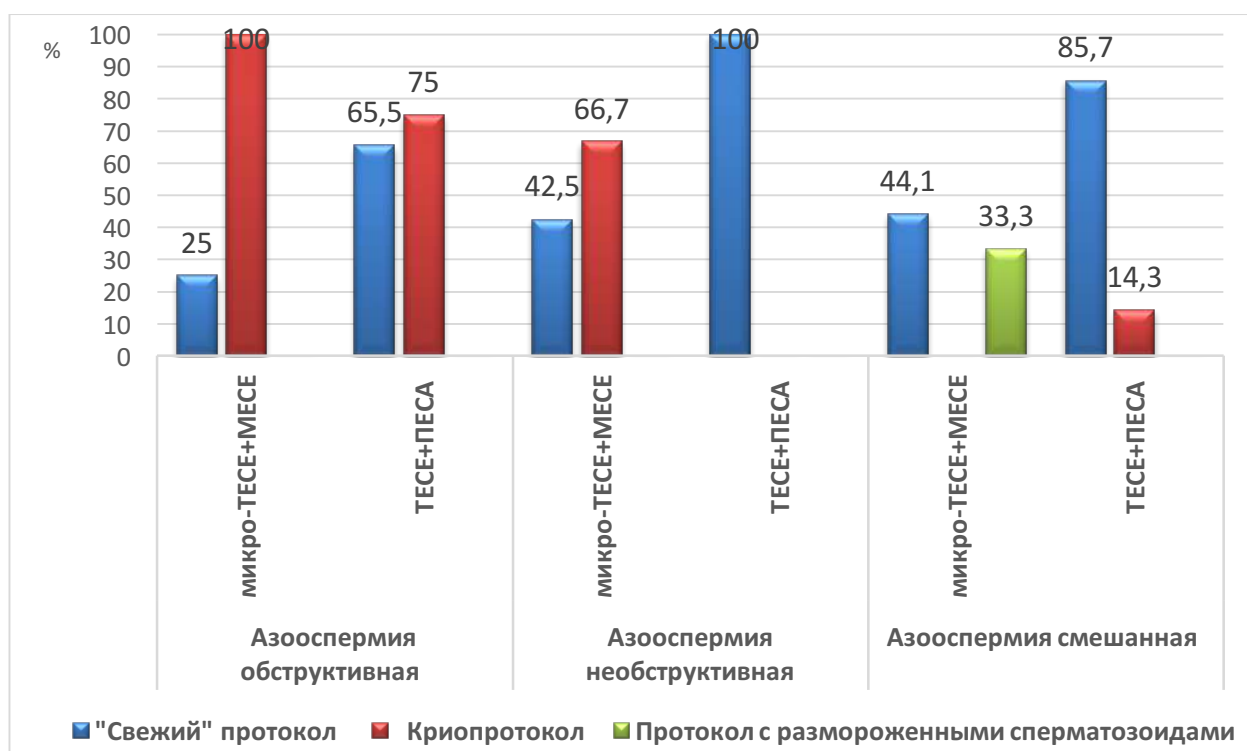


Рисунок 6.5 — Суммарное количество беременностей в зависимости от методов извлечения сперматозоидов, $p > 0,05$, ($n=214$)

Перенос замороженных/размороженных эмбрионов способствовал наступлению беременности: после микро-ТЕСЕ+МЕСА – в 100% в группе с ОА и 66,7% – НОА, ТЕСЕ+ПЕСА – при ОА чаще, чем при смешанной азооспермии – практически в пять раз (70% против 14,3%).

После оплодотворения ооцитов размороженными сперматозоидами мужа, извлечение которых осуществляли с помощью микродиссекции, беременность наступила у трети пар из группы со смешанной азооспермией.

В Таблице 6.3 представлены данные об исходе проведенных циклов лечения - частоты имплантации (ЧИ) и ЧНБ в зависимости от различных методик извлечения сперматозоидов. В «свежих» протоколах ЧИ после оплодотворения сперматозоидами, полученными методом ТЕСЕ+ПЕСА, оказалась статистически значимо больше в парах с наличием у мужчин ОА - практически в пять раз (53,6% против 11,1%, $p < 0,05$) и НОА – в два раза (42,8% против 23,3%).

Таблица 6.3 — Исходы «свежих» протоколов ЭКО

Группы			Количество начатых циклов	Отказы от переносов эмбрионов/проведения протоколов	Количество проведенных циклов	Частота имплантации	Беременности клинические
Азооспермия обструктивная	микро-ТЕСЕ+МЕСА	абс.	28	12	16	4/36	4/16**
		%				11,1	
	ТЕСЕ+ПЕСА	абс.	58	0	58	44/82**	34/58
		%				53,6	
Азооспермия необструктивная	микро-ТЕСЕ	абс.	112	18	94	35/150	40/94
		%				23,3	
	ТЕСЕ+ПЕСА	абс.	6	6	0	3/7	3/6
		%				42,8	
Азооспермия смешанная	микро-ТЕСЕ+МЕСА	абс.	68	4	64	29/146	26/64
		%				19,9	
	ТЕСЕ+ПЕСА	абс.	40	4	36	20/86*	20/36
		%				23,2	
						**<0,001	**0,018
						*<0,001	

Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, ** - внутригрупповые отличия, ∞ - от всех групп, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

ЧИ при смешанной азооспермии состоялась в 21,5% в среднем, с наибольшим показателем в группе с ОА – после ТЕСЕ+ПЕСА – практически в пять раз (53,6% против 11, %, $p < 0,0001$). ЧНБ на ПЭ после экстракции сперматозоидов методом ТЕСЕ+ПЕСА составила 54,7% в среднем, микро-ТЕСЕ+МЕСА – 41,5% в парях с наличием у мужчин НОА и смешанной азооспермии, с ОА – у четверти ($p = 0,018$) – вдвое меньше, чем после ТЕСЕ+ПЕСА.

После переноса эмбрионов, витрифицированных на стадии бластоцисты, ЧИ оказалась наибольшей в парях с выявленной у мужчин ОА:

у трети, где методом экстракции сперматозоидов выступала микро-ТЕСЕ+МЕСА и 45,4% - ТЕСЕ+ПЕСА (Таблица 6.4).

Таблица 6.4 — Исходы криопротоколов

Группы			Количество начатых циклов	Отказы от переносов эмбрионов	Количество Переносов эмбрионов	Частота имплантации	Беременности клинические
Азооспермия обструктивная	микро-ТЕСЕ+МЕСА	абс.	4	0	4	4/12	4/4
		%				33,3	100,0
	ТЕСЕ+ПЕСА	абс.	16	0	16	10/22	12/16
		%				45,4	75,0
Азооспермия необструктивная	микро-ТЕСЕ	абс.	18	0	18	12/28	12/18
		%				42,8	66,7
	ТЕСЕ+ПЕСА	абс.	0	0	0	0	0
		%				0	0
Азооспермия смешанная	микро-ТЕСЕ+МЕСА	абс.	8	0	8	0	0
		%				0	0
	ТЕСЕ+ПЕСА	абс.	28	0	28	8/62*	4/28*
		%				12,9	14,3
						*0,002	*<0,001

Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

В группе НОА в криопротоколе перенос эмбрионов, полученных после оплодотворения ДС, дал более высокие результаты наступления беременности (62,5% против 45,2% в «свежем» протоколе).

Таблица 6.5 — Исходы протоколов ЭКО с размороженными сперматозоидами

Группы			Количество начатых/ проведенных циклов	Частота имплантации	Беременности клинические
Азооспермия обструктивная	микро- ТЕСЕ+ МЕСА	абс.	16/12	0	0
		%		0	0
	ТЕСЕ+ ПЕСА	абс.	0	0	0
		%		0	0
Азооспермия необструктивная	микро-ТЕСЕ	абс.	0	0	0
		%		0	0
	ТЕСЕ+ ПЕСА	абс.	0	0	0
		%		0	0
Азооспермия смешанная	микро- ТЕСЕ+ МЕСА	абс.	16	4/36	4/16
		%		11,1	25
	ТЕСЕ+ ПЕСА	абс.	0	0	0
		%		0	0

$p > 0,05$

После использования в программах ЭКО-ИКСИ размороженных сперматозоидов ЧИ и ЧНБ составила 11,1% и 25% соответственно.

В Таблице 6.6 показано, что в «свежих» протоколах применение сперматозоидов мужа при НОА и смешанной азооспермии способствовало наступлению беременностей в 1,3 раза реже, чем с ОА (60% против 47,0% в среднем).

Таблица 6.6 — Исходы программ ЭКО-ИКСИ с использованием различных видов спермы (муж, донор)
(расчет на каждый тип)

Группы			Беременности			Репродуктивные потери	Биохимические беременности	
			сперма мужа	донора	мужа+ донора	сперма мужа	сперма донора	сперма мужа
Свежий протокол	Азооспермия обструктивная	абс.	42	0	0	4	0	0
		%	60,0	0	0	6,7	0	0
	Азооспермия необструктивная	абс.	24	19	3	10	6	0
		%	46,1	45,2	100,0	19,2	14,3	0
	Азооспермия смешанная	абс.	46	4	4	4	4	4
		%	47,9	100,0	100,0	4,2	100,0	4,2
Криопротокол	Азооспермия обструктивная	абс.	12	4	0	0	4	0
		%	75,0	100,0	0	0	25,0	0
	Азооспермия необструктивная	абс.	5	5	2	0	0	0
		%	62,5	62,5	100,0	0	0	0
	Азооспермия смешанная	абс.	4	0	0	0	0	0
		%	16,7	0	0	0	0	0
Протокол с размороженной спермой	Азооспермия смешанная	абс.	4	0	0	0	0	0
		%	25,0	0	0	0	0	0

p>0,05

Использование ДС у мужчин с НОА в криопротоколе дало более высокие результаты наступления беременности (62,5% против 45,2% в «свежем» протоколе). Наиболее эффективным (ЧНБ – 100%) применение ДС оказалось в свежих протоколах при смешанной азооспермии, в крио- – у мужчин с ОА.

Сочетанный вариант – сперматозоиды мужа и донора – при НОА – в «свежем» и криопротоколах, смешанной азооспермии – цикле с нативными гаметамии привели к беременности в 100%. Репродуктивные потери в выборке с нативными сперматозоидами мужа отмечали чаще при НОА (19,2%) – в четыре раза (5,4%) в сравнении с другими типами азооспермии. Констатация биохимических беременностей в группе со смешанной азооспермией состоялась: при использовании нативных сперматозоидов мужа в 4,2%, донора – в 100%; при НОА – в 14,3% циклов с ДС, вдвое чаще – в криопротоколах при ОА (25%).

Применение сперматозоидов мужа в «свежих» протоколах, полученных в исходе микро-ТЕСЕ, привело к наступлению беременности в группе пар с ОА в полтора раза реже (25,0% против 38,5%, чем в остальных, $p < 0,001$), ТЕСЕ+ПЕСА – у всех с НОА и смешанной азооспермией и 70,4% – с ОА (Таблица 6.7).

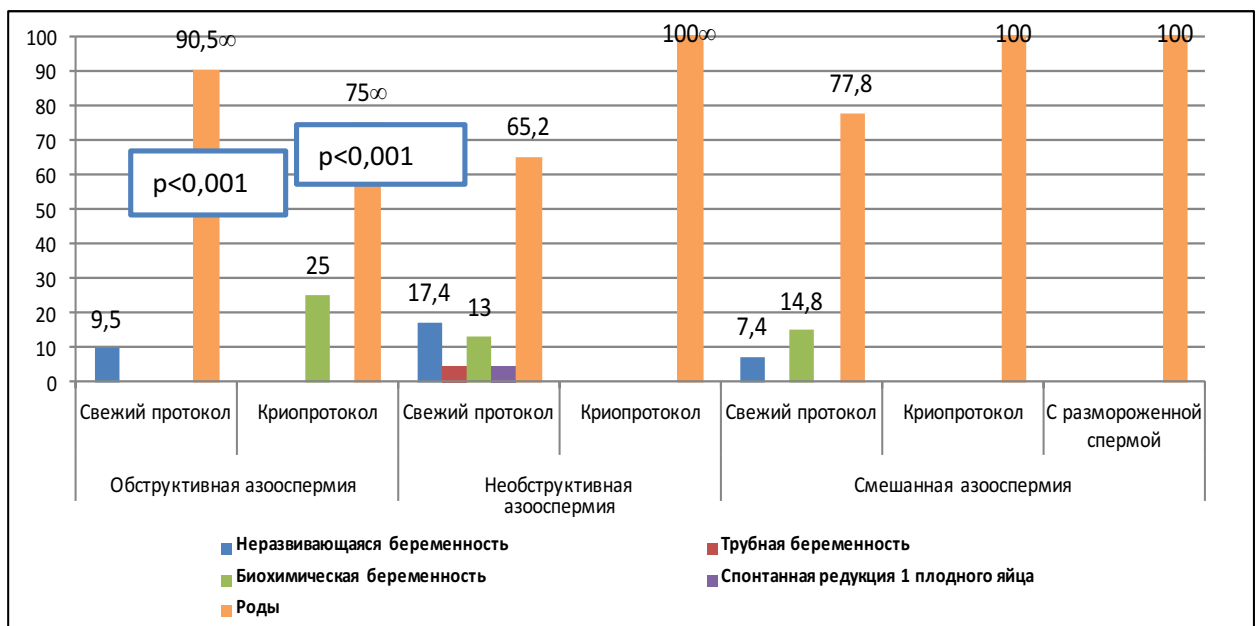
Таблица 6.7 — Виды используемой спермы в протоколах, завершившихся наступлением беременности

Группы		Протокол оплодотворения нативными сперматозоидами			Протокол переноса замороженных/ размороженных эмбрионов			Протокол оплодотворения (ИКСИ) размороженными сперматозоидами
		Сперма мужа	Сперма мужа и донора	Сперма донора	Сперма мужа	Сперма мужа и донора	Сперма донора	Сперма мужа
Азооспермия обструктивная	микро- ТЕСЕ+ МЕСА	25,0*	0	0	0	0	100,0	0
	ТЕСЕ+ ПЕСА	70,4	0	0	75,0	0	0	0
Азооспермия необструктивная	микро-ТЕСЕ	40,4	100,0	41,0	62,5	0	62,5	0
	ТЕСЕ+ ПЕСА	100,0	100,0	100,0	0	0	0	0
Азооспермия смешанная	микро- ТЕСЕ+ МЕСА	36,7	100,0	100,0	0	33,3	0	33,3
	ТЕСЕ+ ПЕСА	100,0	100,0	100,0	16,7*	0	0	0
		*<0,001			*<0,001			

Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от группы со смешанной азооспермией, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Наступление беременности состоялось во всех протоколах с сочетанным применением сперматозоидов мужа и донора, как и изолированной ДС, с меньшим показателем в парах, где нерезультативными оказались микро-ТЕСЕ (41,0%). При оценке эффективности криопротоколов с ПЭ, полученных в результате ИКСИ сперматозоидами мужа, ЧНБ составила 16,7% при смешанной азооспермии и 75% – ОА, микро-ТЕСЕ – у 62,5% представителей с НОА ($p < 0,001$). Доля беременностей после криопереноса в исходе сочетанного применения сперматозоидов мужа и ДС – 33,3%. ЧНБ в криоциклах с эмбрионами от ДС – вследствие отрицательных результатов микро-ТЕСЕ – 100% при ОА и 62,5% – НОА. Исходы протоколов ЭКО-ИКСИ со сперматозоидами мужа, полученными в исходе пункций микро-ТЕСЕ+МЕСА и подвергшихся криоконсервации, – беременности у 33,3% пар из группы со смешанной азооспермией.

Данные об исходах беременностей представлены на Рисунке 6.6.



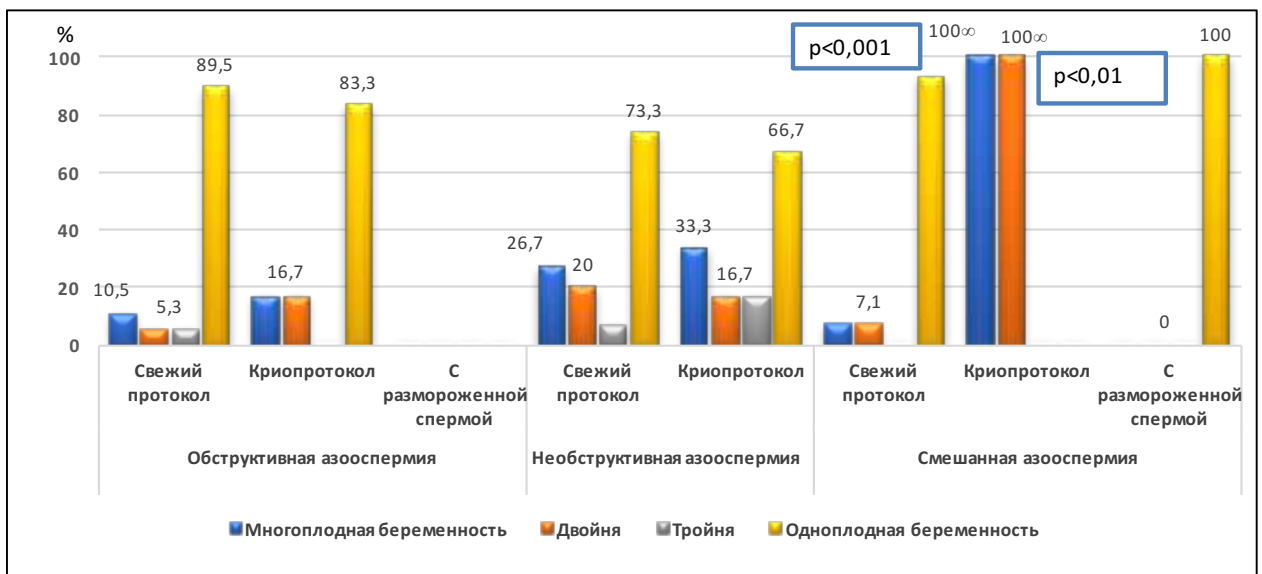
Примечание * ($p < 0,001$) – статистическая значимость отличий от всех групп (одноименный протокол), точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний), ($n=214$)

Рисунок 6.6 — Исходы беременностей в программах ВРТ.

Неразвивающуюся беременность (НБ) констатировали только в протоколах ЭКО-ИКСИ со свежеполученными сперматозоидами: при НОА –

вдвое чаще, чем других видах азооспермии (17,4% против 8,4%). Трубная беременность зарегистрирована у женщин из группы мужчин с НОА (4,3%). Показатель преглинического спонтанного аборта/выкидыша (биохимической беременности (Б/хБ)) составил 13,9% – в «свежих» протоколах пар с НОА и смешанной азооспермией и у четверти – в криоциклах с ОА. Спонтанная редукция одного плодного яйца из двойни зарегистрирована в 4,3% в «свежем» протоколе при НОА. Показатель живорождения оказался наибольшим после переноса размороженных эмбрионов: в 100% при НОА и смешанной азооспермии, 75% – ОА ($p < 0,05$). Деторождением в «свежем» протоколе завершились 90,5% беременностей в парах с ОА, в полтора раза реже – НОА (65,2%, $p < 0,05$) и 77,8% ($p < 0,05$) – смешанной азооспермией.

Показатель многоплодных беременностей преобладал в парах с НОА: в «свежем» протоколе и криоциклах практически вдвое в сравнении с ОА (30% против 13,6%) при наименьшем значении в группе со смешанной азооспермией (7,1%) (Рисунок 6.7).



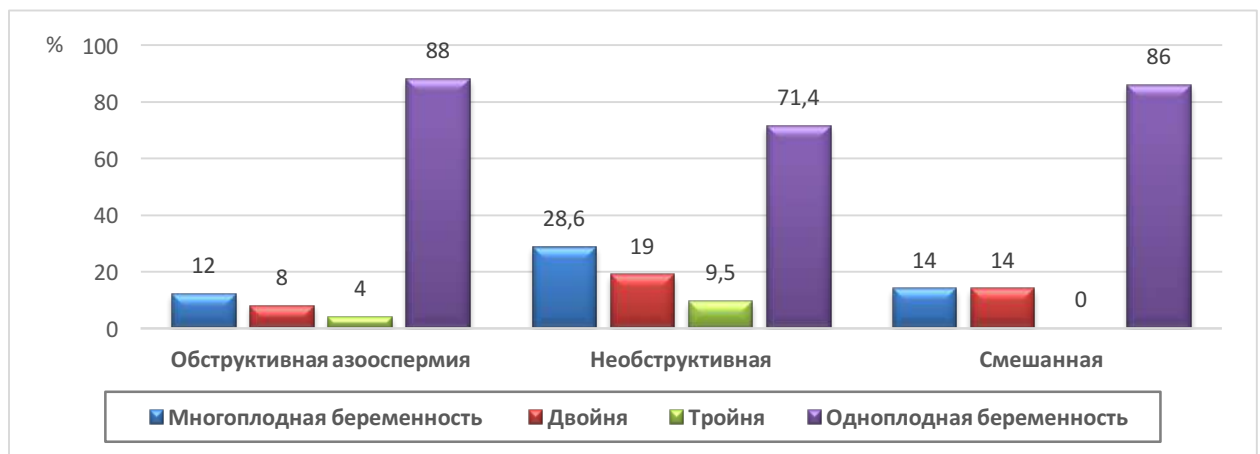
Примечание [∞] ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от всех групп, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний), ($n=175$)

Рисунок 6.7 — Количество плодов в протоколах ЭКО-ИКСИ.

В парах со смешанной азооспермией все беременности после переноса размороженных эмбрионов были двойнями (100,0%). Двойни преобладали в «свежем» протоколе: у каждой пятой пары из группы с НОА, втрое реже –

при других типах азооспермии (6,2%). Частота двоен в криоциклах составила 16,7% в среднем в группах с ОА и НОА ($p < 0,05$). Тройни чаще отмечали в парах с НОА – в криопротоколах в сравнении со «свежими» программами, в том числе при ОА (16,7% против 6,0%). Одноплодные беременности реже всего выявлены в группах с НОА (70,0%), в «свежем» протоколе – в 1,2 раза, чем при других типах азооспермии (91,2%). Аналогичную тенденцию наблюдали в криопротоколах (66,7% при НОА против 83,3% при ОА). Все беременности после протоколов с использованием для оплодотворения размороженных сперматозоидов завершились рождением одного плода.

Суммарный показатель многоплодия при НОА (28,6% против 13,0%) превалировал за счет двоен (19,0% против 11,0% в остальных группах) (Рисунок 6.8).



$p > 0,05$

Рисунок 6.8 — Суммарный показатель количества плодов при деторождении Точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний), ($n=175$)

В отношении троен тенденция была аналогичной (9,5% против 4,0% при ОА). Частота одноплодных родов составила 81,8% в среднем.

Данные об исходах протоколов ЭКО-ИСКИ представлены в Таблице 6.8.

Таблица 6.8 — Исходы протоколов ЭКО-ИКСИ суммарно

Группы		Протокол с нативными сперматозоидами		Криопротокोल		Повторный протокол с размороженными сперматозоидами		Всего	
		Частота имплантации	Частота наступления беременности	Частота имплантации	Частота наступления беременности	Частота имплантации	Частота наступления беременности	Частота имплантации	Частота наступления беременности
Азооспермия обструктивная	абс.	48/118 ∞	38/74	14/34	16/20	0	0	62/152 ∞	54/94
	%	40,7	51,3	41,1	80,0	0	0	40,8	57,4
Азооспермия необструктивная	абс.	38/157	55/100	12/28	12/18	0	0	50/185	67/118
	%	24,2	55,0	42,8	66,7	0	0	27,0	56,8
Азооспермия смешанная	абс.	49/226	46/100	8/62*	4/28	4/36	4/16	61/324	54/144*
	%	21,7	46,0	12,9	14,3	11,1	25	18,8	37,5
		∞ 0,004						∞ 0,008	
				*0,002					*0,003

Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ОА, ∞ - от всех групп, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)

Имплантация в «свежих» протоколах ЭКО-ИКСИ при наличии у мужчин НОА и смешанной азооспермии состоялась в 22,9% в среднем, при ОА – в 40,7% ($p=0,004$), ЧНБ – 50,8% в среднем. ЧИ в криопотоколах при смешанной азооспермии оказалась практически в три раза меньше, чем в остальных группах (12,9% против 41,9%)($p=0,002$). ЧНБ преобладала при ОА (80%), составила 66,7% при НОА и 14,3% – при смешанной азооспермии.

Исходом протоколов с использованием размороженных сперматозоидов в парах с наличием у мужчин смешанной азооспермии являлось наступление клинических беременностей у четверти, при ЧИ в 11,1%. Суммарный показатель ЧИ в парах с ОА составил 40,8%, в полтора раза меньше (27%)($p=0,008$) – при НОА и 18,8% – смешанной азооспермии ($p < 0,05$). Показатель клинических беременностей оказался сопоставим при наличии у мужчин ОА и НОА (в среднем, 57,1%) и 37,5% – смешанной азооспермии ($p=0,003$).

Данные о количестве и качестве ооцитов, оплодотворении и развитии эмбрионов на ранних этапах представлены в Таблице 6.9.

Таблица 6.9 — Эмбриологические аспекты протоколов ЭКО-ИКСИ

Группы		N	Общее количество ооцитов	Количество ооцитов МП	Количество нормально оплодотворенных ооцитов 2PN	Количество бластоцист	Количество бластоцист высокого качества	Количество эмбрионов на перенос	Количество криоконсервированных эмбрионов
Азооспермия смешанная	«свежий» протокол	74	16,7±3,8	13,8±3,6	10,8±4,2	5,9±1,4	3,5±0,8	1,3±0,4	3,2±1,2
	с размороженными сперматозоидами	16	14,6±4,2	10,3±3,8	9,2±1,8	6,0±1,8	3,2±0,6	1,2±0,5	0
Необструктивная азооспермия	«свежий» протокол	58	15,5±3,1	12,6±2,5	6,7±2,5*	4,8±0,6*	2,9±0,5*	1,4±0,5	2,9±0,5*
	с размороженными сперматозоидами	3	12,1±2,5	11,8±4,6	7,2±3,2	4,2±1,4*	2,5±0,8*	1,3±0,3	0
Обструктивная азооспермия	«свежий» протокол	100	12,8±2,6	12,7±2,2	9,4±2,6	5,2±0,6	3,8±0,5	1,5±0,6	3,5±0,5
	с размороженными сперматозоидами	16	13,7±3,7	13,4±2,7	7,8±2,4	6,4±1,2	3,0±0,4	1,3±0,5	0
					*0,043	*<0,001	*<0,001		*0,003
						*0,02	0,006		

Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от остальных групп в одноименных протоколах, (параметрический метод Стьюдента-Ньюмана-Кейлса и Краскала-Уоллиса)

Среднее количество аспирированных ооцитов, как и их зрелых форм по группам статистически значимо не отличались.

Показатель нормально оплодотворенных ооцитов 2PN и количество бластоцист высокого качества в группе с НОА уступал аналогичным в остальных группах ($p < 0,001$). Доля эмбрионов на перенос в группах не отличалась, удельный вес количества подвергшихся криоконсервации – в парах с НОА – ниже ($p = 0,003$).

Количество переносов размороженных эмбрионов в группах было сопоставимым ($1,2 \pm 0,5$ в среднем).

Анализ эмбриологических показателей при использовании в протоколах размороженных сперматозоидов показал различия среди всех параметров только по удельному весу нормально оплодотворенных ооцитов 2PN ($p = 0,043$) и количеству бластоцист высокого качества (БВК) в группе с НОА аналогично данным в «свежем» протоколе ($p < 0,001$ – для «свежего» протокола, $p = 0,06$ – с размороженными сперматозоидами).

6.1.2. Влияние носительства мутаций AZF региона Y-хромосомы, полиморфизмов генов CFTR и AR на ультраструктурные параметры сперматозоидов и связь с частотой наступления беременности.

Наступление беременности отмечали: в парах с ОА – у трети мужчин с мейотической катастрофой и нарушением формирования структуры полового тельца, смешанной азооспермией – 75% с фрагментацией СинК (Таблица 6.10).

Таблица 6.10 — Исходы программ ЭКО-ИКСИ в зависимости от состояния СинК в сперматоцитах I порядка

Группы		N	Беременность наступила	Отсутствие беременности	Неразвивающаяся беременность	Роды	Использована сперма мужа	
Азооспермия обструктивная	мейотическая катастрофа	абс.	2	4	0	2	6	
		%	33,3	66,7	0	33,3	100,0	
	нарушение формирования полового тельца	абс.	2	4	0	2	6	
		%	33,3	66,7	0	33,3	100,0	
	блок мейоза на стадии пахитены	абс.	2	10	2	0	12	
		%	16,7	83,3	16,7	0	100,0	
Азооспермия необструктивная	блок на стадии зиготены	абс.	0	5	0	0	0	
		%	0	100	0	0	0	
	блок на стадии лептотены	абс.	5	0	0	0	0	
		%	100	0	0	0	0	
	блок на стадии пахитены	абс.	14	4	9	4	9	
		%	77,8	22,2	50,0	22,2	50,0	
	атипичная архитектура ядра	абс.	0	0	0	0	0	
		%	0	0	0	0	0	
	Азооспермия смешанная	блок на стадии пахитены	абс.	6	6	2	4	0
			%	50,0	50,0	16,7	33,3	0
фрагментация синаптонемного комплекса		абс.	6	2	2	4	6	
		%	75,0	25,0	25,0	50,0	75,0	

p>0,05

Среди мужчин с азооспермией, имеющих блок мейоза на стадии пахитены, эффективность циклов ЭКО-ИКСИ констатирована у 77,8% пар с НОА, половины – со смешанной азооспермией, 16,7% – ОА. Родами завершились все беременности в группе ОА, за исключением представителей с пахитенным арестом, при смешанной азооспермии – у половины с фрагментацией СинК. Роды состоялись в парах с наличием у мужчин блока мейоза на стадии пахитены: в 22,2% при НОА и трети – со смешанной азооспермией. НБ выявляли в парах с констатацией по цитогенетическому анализу половых клеток блока мейоза на стадии пахитены: у половины с НОА и 16,7% – смешанной азооспермией (из 77,8% и 50% соответственно). Регрессировала и единственная беременность в паре с ОА (16,7%). В программе ЭКО-ИКСИ сперма мужа была использована при ОА, у половины мужчин с НОА и блоком мейоза на стадии пахитены и 75% - со смешанной азооспермией и фрагментацией СинК.

Анализ влияния носительства микроделеций AZFc региона Y-хромосомы, полиморфизмов гена *CFTR* и их сочетания на эффективность циклов ЭКО-ИКСИ и ЧНБ представлен в Таблице 6.11.

Выявление на ультратонких срезах клеток Сертоли, сперматогоний и клеток всего ряда спермиогенеза вплоть до зрелых сперматид с нормальным конденсированным хроматином и сформированной акросомой позволяет применять их для оплодотворения в программе ЭКО-ИКСИ.

Использование нативных свежеполученных сперматозоидов в протоколе ЭКО-ИКСИ завершилось наступлением беременности: при носительстве микроделеций AZFc Y-хромосомы в 16,7% при НОА и в 100% – при смешанной азооспермии; полиморфизмах *CFTR* при НОА – в 33,3%, смешанной азооспермии – в 100%, при ОА – 50%.

Таблица 6.11 — Исходы протоколов ЭКО-ИКСИ в зависимости от различных генетических полиморфизмов

Группы			N	«Свежий» протокол				Криопротокोल, Эмбрион донора	Беременность в «свежем» протоколе			Беременность в криопротокolle, Сперма донора
				Сперма мужа	Отказ от протокола	Сперма донора	Сперма донора + мужа		Сперма мужа	Сперма донора	Сперма донора+ мужа	
Азооспермия необструктивная	AZF b/b,c	абс.	9	0	0	9	0	0	0	3	0	0
		%		0	0	100,0	0	0	33,3	0	0	
	AZFc	абс.	12	7	5	2	0	2	2	2	0	2
		%		58,3	41,7	16,7	0	16,7	16,7	16,7	0	16,7
	AZFc+ CFTR мутации	абс.	6	4	2	4	0	0	0	0	0	0
		%		66,7	33,3	66,7	0	0	0	0	0	0
CFTR мутации	абс.	6	3	0	3	0	0	2	0	0	0	
	%		50,0	0	50,0	0	0	33,3	0	0	0	
Азооспермия смешанная	AZFc	абс.	3	3	0	0	0	0	3	0	0	0
		%		100,0	0	0	0	0	100,0	0	0	0
	AZFc+ CFTR мутации	абс.	6	3	0	0	3	0	0	0	3	0
		%		50,0	0	0	50,0	0	0	0	50,0	0
	CFTR мутации	абс.	9	9	0	0	0	0	9	0	0	0
		%		100,0	0	0	0	0	100,0	0	0	0
AR-повторы	абс.	3		0	3	0	0	0	3	0	0	
	%			0	100,0	0	0	0	100,0	0	0	
Азооспермия обструктивная	CFTR мутации	абс.	6	3	0	0	0	0	3	0	0	0
		%		50,0	0	0	0	0	50,0	0	0	0
	AR-повторы	абс.	3	3	0	0	0	0	3	0	0	0
		%		100,0	0	0	0	0	100,0	0	0	0

p>0,05

Наличие в генотипе мужчин менее 21 САG повтора гена *AR* способствовало наступлению беременности в парах с ОА в 100%, комбинации мутации *AZFc* с полиморфизмом *CFTR* – в сочетании с ДС – в 50%.

Влияние макро- и ультраструктурных особенностей сперматозоидов на возможность экстракции зрелых сперматид подтверждает ряд выявленных закономерностей. К ДС прибегали при невозможности выделения сперматозоидов из тестикулярной ткани ввиду их отсутствия – при синдроме «только клетки Сертоли» у мужчин, перенесших курсы химиотерапии. Блок мейоза в пахитене с наличием большого количества пахитенных сперматоцитов и только единичных деградирующих зрелых сперматид также оправдывал применение донорских сперматозоидов.

Гистологическое исследование биоптата яичка позволило установить, что наличие синдрома клеток Сертоли (СКС) 2-го типа сопровождалось наличием единичных половых клеток в сперматогенном эпителии в сравнении с синдромом «только клеток Сертоли», что указывало на частичную сохранность сперматогенеза. Отсутствие в двух предназначенных для цитогенетического исследования образцах распластанных ядер сперматоцитов I типа зрелых сперматозоидов обусловлено, очевидно, очаговым характером сперматогенеза (при взятии биопсийного материала для электронно-микроскопического исследования очаги сперматогенеза не попали в фиксатор, тогда как из другого фрагмента семенного канальца для оплодотворения методом ИКСИ было выделено большое количество сперматозоидов). Несмотря на отсутствие в анамнезе мужчин с крипторхизмом в ультратонких срезах при ЭМИС удлинённых сперматид с конденсированным хроматином, нормально протекающую беременность удалось получить у трех женщин.

Ниже приведены два клинических случая тактики ведения мужчин с азооспермией.

Клинический случай №1

Пациент А. 33 лет, обратился в отделение ВРТ ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России с жалобами на отсутствие беременности в первом зарегистрированном браке в течение 10 лет.

Супруге Б. 31 год. Дз: Трубно-перитонеальное бесплодие.

Диагноз пациента: Бесплодие первичное. Гипергонадотропный гипогонадизм. Смешанная азооспермия с преобладанием секреторной формы. Хронический калькулезный везикулостатит, эпидидимит. Гипоплазия обоих яичек. Врожденная аномалия, промежностная форма гипоспадии, двусторонний крипторхизм. Состояние после множественных реконструктивных операций по низведению яичек при паховой ретенции и пластике уретры.

Из анамнеза: при рождении - двусторонний крипторхизм и промежностная форма гипоспадии. В 6 лет: множественные операции по низведению яичек при их паховой ретенции (№5) и гипоспадии уретры (№6). В 15 лет – острый эпидидимит, противовоспалительная терапия. В 22 года - острый уретрит, пролечен.

В процессе операции микро-ТЕСЕ справа: извлечено 35 микрофрагментов ткани яичка объемом 0,3 см³. Сперматозоиды из семенных канальцев при cito исследовании получены в небольшом количестве, подвижные. При проведении МЕСА справа выявлены рубцовая ткань, сперматозоиды не получены. Часть сперматозоидов использована для оплодотворения, другая подвергнута витрификации.

Гистологическое заключение: Мозаичная картина сперматогенеза от многочисленных семенных канальцев с только клетками Сертоли 2-3 балла по шкале Johnsen SG, в основной массе срезов - на уровне сперматоцитов 1 порядка, до единичных канальцев с сохраненным сперматогенным эпителием (8-9 баллов по шкале Johnsen SG).

Супруге пациента назначена стимуляция суперовуляции в коротком протоколе со 2-го дня менструального цикла препаратами р-ФСГ (Гонал Ф, 225 МЕ ежедневно в течение 8 дней). Для предотвращения пика ЛГ вводились анта-ГнРГ (Цетротид 0,25 мг однократно. Треггер овуляции – Прегнил 10000Ед. Через 36 часов после триггера проведена пункция фолликулов под контролем УЗИ, получено четыре зрелых ооцита на стадии МП. После оплодотворения методом ИКСИ сперматозоидами пациента получены три зиготы 2pn. Перенос эмбрионов категории 8ab, 8ab проведен на 3 сутки развития. Один эмбрион продолжали культивировать до 5 суток – 3АА - витрифицирован. Анализ крови на ХГч через две недели отрицательный. Терапия поддержки лютеиновой фазы отменена.

Второй протокол ЭКО с замороженными/размороженными сперматозоидами пациента по аналогичной схеме подготовки супруги проведен через три месяца. Получено 9 зрелых ооцитов: 4 - оплодотворены сперматозоидами мужа, 5 - донора по обоюдному добровольному согласию супругов. Перенос эмбрионов категории 4b (единственного, полученного от размороженных сперматозоидов мужа), и 8a (от донора) выполнен на 3 сутки развития. Криоконсервации на 5 сутки подверглись лишь 2 эмбриона на стадии морулизации от донора. Беременность не наступила.

Следующий протокол ЭКО решено провести по программе КРИО (перенос размороженных эмбрионов). Перенос эмбрионов состоялся на 21 день менструального цикла в среднесрединную фазу после размораживания одного эмбриона от мужа (первая программа ИКСИ) и двух - от донора (вторая программа ИКСИ).

Исход: трихориальная, триамниотическая тройня. Родоразрешение было преждевременным на 32 неделе беременности в виду начала родовой деятельности и дородового излития околоплодных вод. Родилось три живых недоношенных мальчика 1250г/40см, 1500г/41см, 1550г/41см без пороков развития.

Клинический случай №2.

Пациент Б. 44 лет, обратился в отделение ВРТ ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России с жалобами на отсутствие беременности в браке в течение 7 лет, брак первый.

Супруге Б. 35 лет. Здорова.

Из анамнеза: острый орхит, левосторонний.

Планирование беременности:

В первом браке: со слов, у супруги – самопроизвольный выкидыш на ранних сроках беременности.

В анамнезе: две неэффективные открытые биопсии правого яичка (2006, 2008гг.), в эякуляте - единичные неподвижные сперматозоиды патологической формы.

Предварительный диагноз после обследования:

Бесплодие вторичное. Нормогонадотропное состояние с незначительным снижением ЛГ без явлений гипогонадизма. Обструктивная форма азооспермии. Хронический орхоэпидидимит. Гипотрофия левого яичка. Сопутствующие заболевания: ожирение 1 ст., дислипидемия.

Выполнены: двусторонняя ПЕСА и ТЕСЕ – выявлены единичные живые подвижные морфологически измененные сперматозоиды из тела правого придатка. Дополнительно: открытая биопсия правого яичка с выделением достаточного количества живых сперматозоидов, витрификация.

Гистология: признаки незавершенного на разном уровне сперматогенеза, в отдельных канальцах до уровня сперматид (Рисунок 6.9-6.10).



Рисунок 6.9. — Этап ПЕСА.

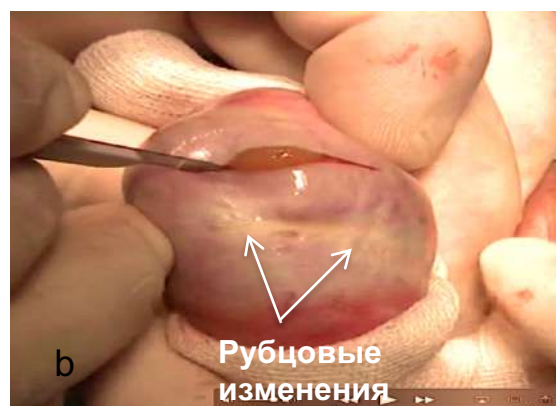


Рисунок 6.10 — а) Рубцовые изменения на коже мошонки, б) на белочной оболочке после предшествующих операций.

Протокол ЭКО №1: Подготовка женщины проводилась по стандартной программе короткого протокола на фоне а-ГнРГ препаратами р-ФСГ (Пурегон 225 МЕ в течение 10 дней). Оплодотворение 11 зрелых ооцитов методом ИКСИ размороженными сперматозоидами мужа не наступило, несмотря на сохранную их жизнеспособность и подвижность.

Протокол ЭКО №2: Подготовка женщины проводилась по аналогичному протоколу. Итогом микро-ТЕСЕ правого яичка и МЕСА его придатка стало извлечение тестикулярных и эпидимальных сперматозоидов из 85 образцов семенных канальцев. Вес извлеченной ткани яичка - 0,782 г.

Использованы для оплодотворения и криоконсервации.

Результаты гистологического и электронно-микроскопического исследований биопсийного материала семенных канальцев представлены на Рисунках 6.11-6.13.

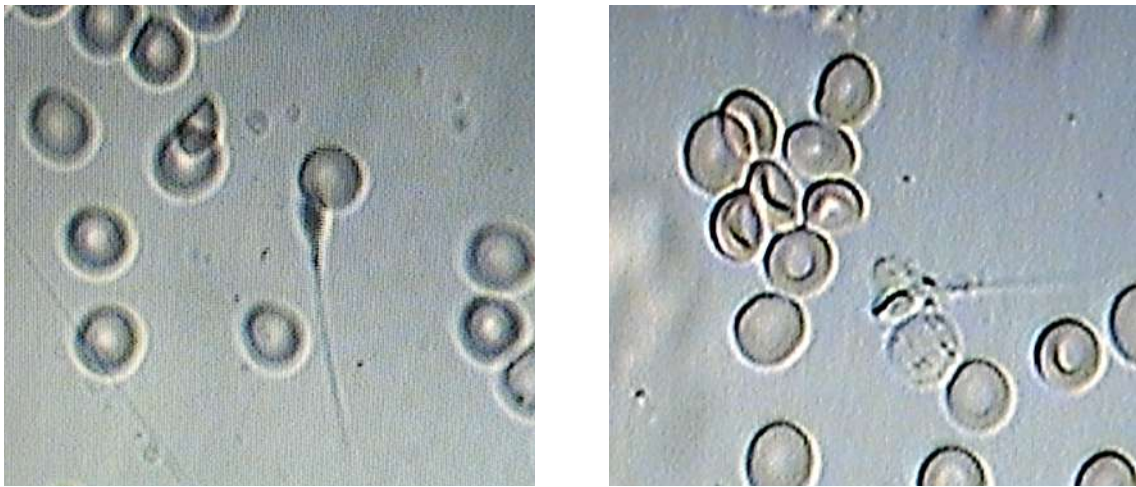


Рисунок 6.11 — Тестикулярные сперматозоиды на фоне эритроцитов

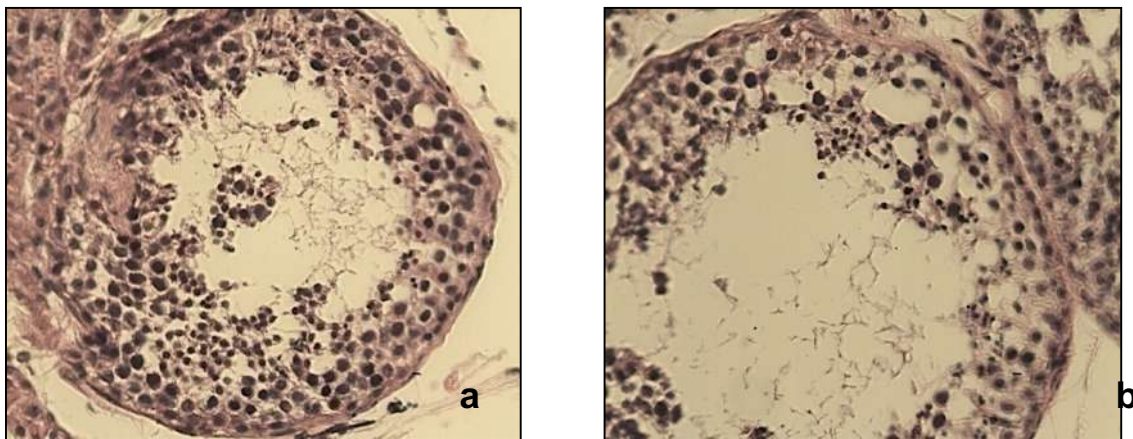


Рисунок 6.12 — а) Гистологический срез семенного канальца с полностью сохраненным сперматогенезом. б) Гистологический срез семенного канальца с частичными участками сохранившегося сперматогенеза.

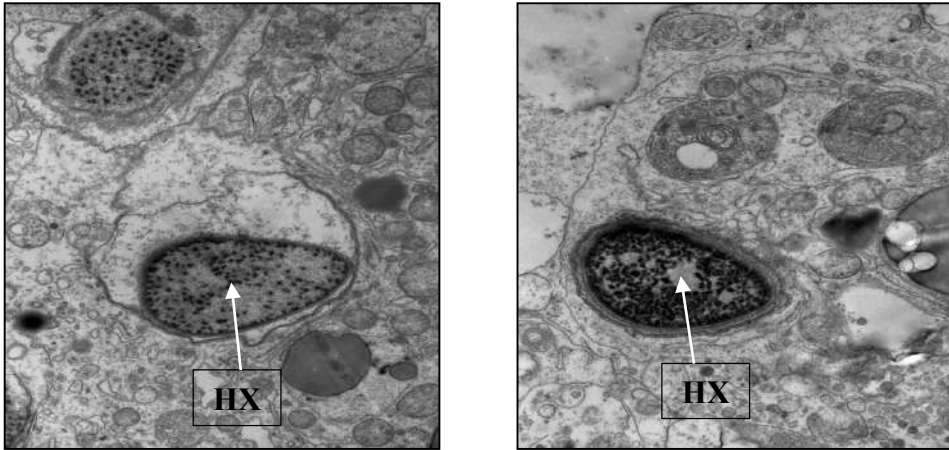


Рисунок 6.13 — Электронная микроскопия биоптата яичка. В ядре выявляются хроматиновые гранулы высокой электронной плотности диаметром 25-50 нм, соединенные в фибриллы менее электронно-плотными зонами, характерными для удлиненных сперматид («незрелый» хроматин).

На 3 сутки развития выполнен перенос 3-х эмбрионов категории 8a, 8ab, 4a (Рисунок 6.14).

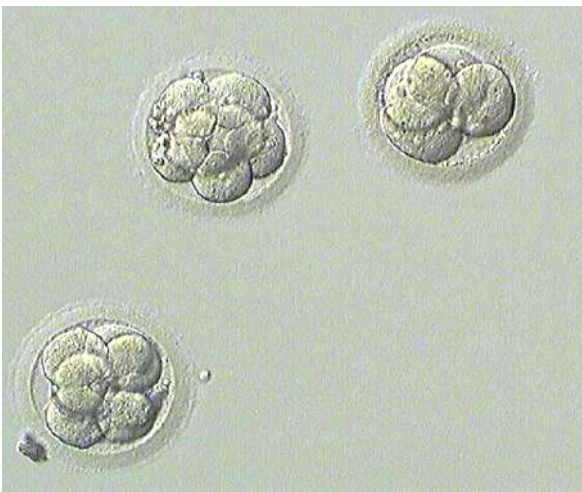


Рисунок 6.14 — Перенесенные эмбрионы на 3 сутки развития.

Через 14 дней после переноса проведен анализ крови на β ХГЧ – 473,0 мМЕ/мл. На 28 день после ПЭ УЗИ органов малого таза: в полости матки визуализируется одно плодное яйцо, один эмбрион (акушерский срок беременности – 6 нед.)

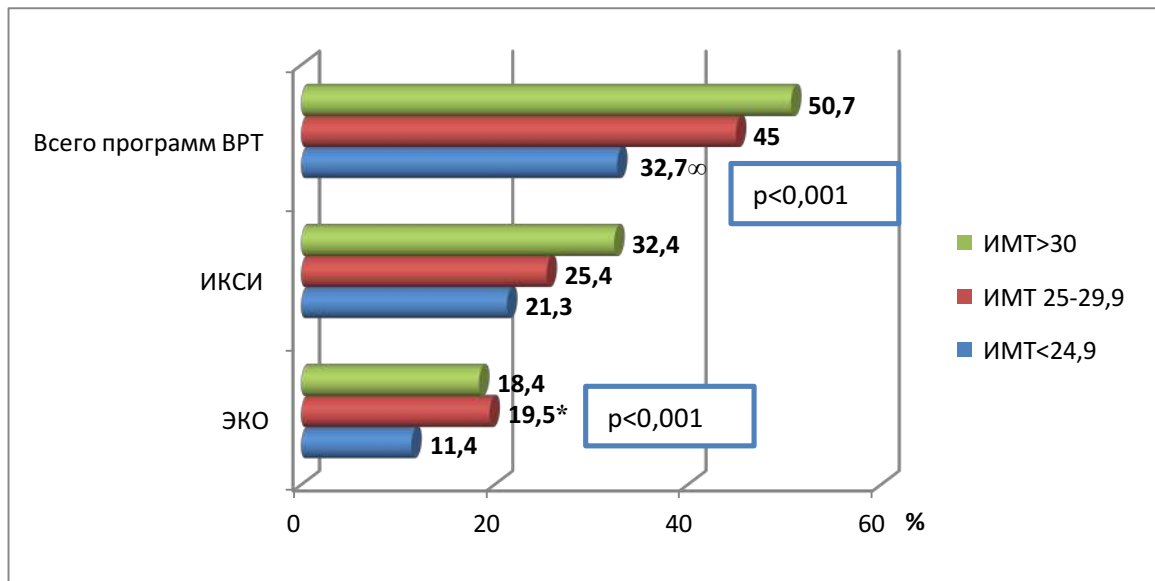
26 ноября 2011г. Преждевременные оперативные роды (кесарево сечение), дородовое излития околоплодных вод на 37нед. Родился живой недоношенный мальчик весом 2640г, ростом 47см, оценка по шкале Apgar 8-9 баллов, без пороков развития.

Комментарии: в результате комплексного обследования мужчины с азооспермией диагноз ОА пересмотрен в пользу смешанной азооспермии. По итогам гистологического исследования и ЭМИС выявлена гетерогенность сперматогенеза. Отмечена значимость и успешность микро-ТЕСЕ по сравнению с чрезкожными аспирационными технологиями и открытыми биопсиями яичек.

Эмбриологический этап по экстракции сперматозоидов из семенных канальцев – наиболее сложный и ответственный в микро-ТЕСЕ (до 6-8 человеко-часов).

6.2. Исходы лечения бесплодия методами ВРТ мужчин с различным ИМТ

Обращение для лечения бесплодия в браке в программы ЭКО-ИКСИ у мужчин было обусловлено рекомендательным характером (вследствие аномальных результатов спермиологического исследования, высокого ИТ, низкой частоты оплодотворения в предшествующих протоколах – 50,0% и менее) (Рисунок 6.15).



Примечание * ($p < 0,001$) – статистическая значимость отличий от группы с ИМТ < 24,9 кг/м², ∞ – от всех групп, точный критерий Фишера для несвязанных групп (двусторонний)
Рисунок 6.15 — Методы искусственного оплодотворения в бесплодных парах с различным индексом массы тела у мужчин.

Среди пар, вступивших в программу ЭКО-ИКСИ, каждая пятая (21,4%) не имела абсолютных показаний к искусственному оплодотворению – решение было продиктовано желанием более быстрого достижения результатов как альтернативы курсам консервативной терапии. В программу ЭКО вступили: 11,4% пар, ИМТ мужчин в которых соответствовал нормальному весу, в полтора раза больше – с ИзбМТ и ожирением (18,9%, $p < 0,001$). К оплодотворению единичными сперматозоидами – метод ИКСИ - в выборке прибегали чаще: при нормовесности каждого пятого, четверти – с ИзбМТ и трети – с ожирением. Потребность в ИКСИ при ожирении мужчины возникала в полтора раза чаще, чем ЭКО (18,4% против 32,4%).

Оценка эмбриологических показателей представлена в Таблице 6.12.

Таблица 6.12 — Характеристики раннего эмбриогенеза в бесплодных парах с различным ИМТ мужчин, Me (25-75 процентиля)

Группы по ИМТ кг/м ²	N	Зрелые ооциты	Количество оплодотворившихся ооцитов	Частота оплодотворения, %	Эмбрионы высокого качества на 3-е сутки развития, %	Количество бластоцист в среднем	Количество бластоцист высокого качества, %
18 - 24,9	66	7 (3-12)	6 (4-9)	87,0 (75-97)	23,8 (0-37)	6 (3-8)	52,4 (43-72)
25 - 29,9	138	7 (4-11)	5 (3-8)	80,0 (68-92)	16,5 (0-32)	4 (2-7)	37,6* (28-46)
≥30	69	5 (4-10)	5* (2-7)	78,0 (56-84)	13,2* (0-40)	3* (2-5)	25,6* (18-37)

Примечание * ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ИМТ «18 - 24,9 кг/м²», Непараметрический U-тест Манна-Уитни

Среднее количество полученных ооцитов варьировало без статистически значимых различий по группам, оплодотворившихся – оказалось наибольшим в отсутствие ИзбМТ и ожирения ($p < 0,05$). Частота оплодотворения статистически значимых отличий по группам не имела. Частота эмбрионов высокого качества на 3-е сутки была сопоставимой и не зависела от ИМТ мужчин, несмотря на большие значения параметра при нормовесности.

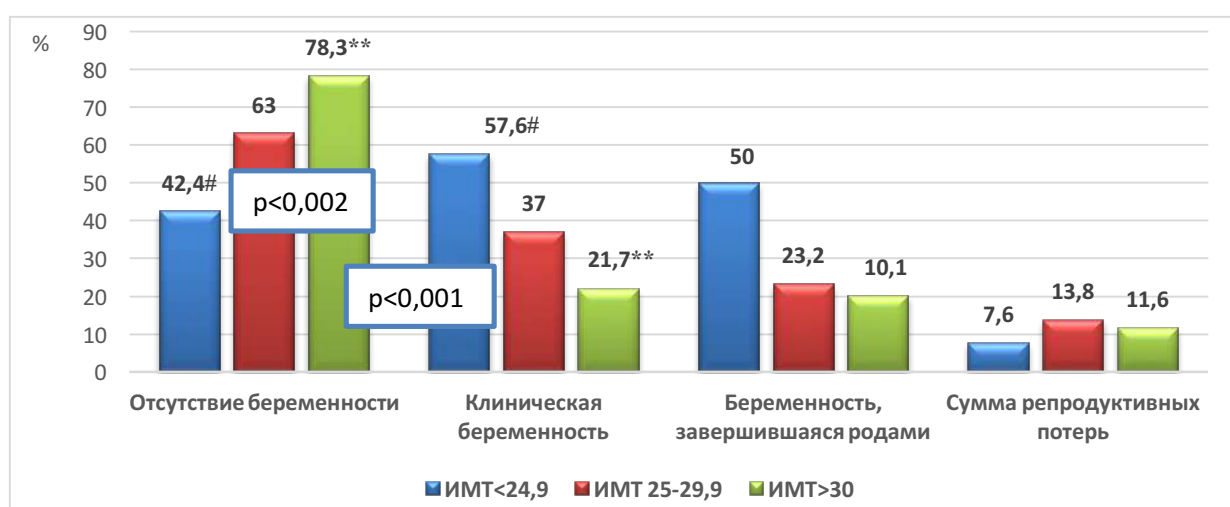
Анализ корреляционных взаимоотношений показал наличие слабой, но статистически значимой отрицательной корреляции ИТ с количеством оплодотворившихся ооцитов ($r = -0,11$, $p = 0,04$), ИФ ДНК гамет с количеством бластоцист высокого качества ($r = -0,14$, $p = 0,04$ и $r = -0,17$, $p = 0,01$ соответственно) и оплодотворившихся ооцитов ($r = -0,18$, $p = 0,008$).

Частота образования бластоцист (5 сутки развития) в парах с нормовесными мужчинами несколько превышала аналогичную в группах с избытком массы тела. Образование бластоцист высокого качества в парах с

наличием у мужчин избытка массы тела оказалось снижено, статистически значимо – в группе с ожирением ($p < 0,05$).

Количество перенесенных эмбрионов в полость матки в парах с различным ИМТ бесплодных мужчин не имело статистически значимых отличий.

ЧНБ преобладала в парах с нормовесными мужчинами (57,6%) при меньших показателях – с избытком массы тела (37,0% – с ИзбМТ ($p < 0,05$) и 21,7% – ожирением ($p < 0,05$))(Рисунок 6.16).



Примечание ** ($p < 0,05$) – статистическая значимость отличий от группы с ИМТ «25-29,9» кг/м², # - от всех групп, (параметрический метод Стьюдента-Ньюмана-Кейлса и Краскала-Уоллиса)

Рисунок 6.16 — Исходы протоколов ЭКО-ИКСИ в парах с различным ИМТ мужчин

Показатель отсутствия беременности экспоненциально возрастал с увеличением ИМТ – с 42,4% до 78,3% – практически в полтора раза ($p < 0,002$) вследствие нерезультативных попыток ЭКО-ИКСИ.

Репродуктивные потери (тубная и неразвивающаяся беременности, самопроизвольные аборты) несколько чаще встречались в группах с ИзбМТ и ожирением в сравнении с нормовесными (12,7% против 7,6%), однако без статистически значимых отличий. Удельный вес беременностей, завершившихся родами, в протоколах ЭКО-ИКСИ в группе с ИМТ «18 - 24,9» кг/м² составил 50,0%, вдвое (23,2%) и в пять раз меньше (10,1%) – с ИзбМТ и ожирением соответственно.

Резюме:**Количество проведенных протоколов:**ЭКО-ИКСИ с нативными тестикулярными и/или эпидидимальными сперматозоидами («свежий» протокол)

- после микро-ТЕСЕ+МЕСА – выше в группе со смешанной азооспермией (94,1% против 53,1%); ТЕСЕ+ПЕСА – с ОА и смешанной азооспермией (100% против 50%);

Криопротocolов:

- ТЕСЕ+ПЕСА – выше в группе со смешанной азооспермией (66,7% против 27,6% – с ОА) при минимальном показателе после микро-ТЕСЕ+МЕСА (6,5% в среднем);

ЭКО-ИКСИ с размороженными тестикулярными и/или эпидидимальными сперматозоидами:

- только после микро-ТЕСЕ+МЕСА – 57,1% с ОА, 23,5% – со смешанной азооспермией и 2,7% – с НОА.

Невозможность/отказ от завершения «свежих» протоколов – только после микро-ТЕСЕ+МЕСА: у 42,9% представителей с ОА, 16,1% – с НОА и 7,9% – со смешанной азооспермией.

Структура причин отказа от ПЭ в протоколах с нативными и замороженными сперматозоидами:

- при смешанной азооспермии – отсутствие цели вступления в протокол ЭКО (только получение сперматозоидов);
- при НОА – нежелание партнеров воспользоваться ДС;
- при ОА – инфекции уrogenитального тракта мужчины, низкое качество ооцитов и эмбрионов (по 33,3%).

Типы (варианты) используемой спермы:

в «свежих» протоколах ЭКО:

- мужа: при ОА и смешанной азооспермии – в 95,3%, НОА – 52,6%;
- ДС – в 45,7% – при НОА и 5,9% – со смешанной азооспермией;

- сочетание спермы мужа и донора – в 5,7% в среднем со смешанной азооспермией и НОА;

в протоколах с размороженными сперматозоидами – только после микро-ТЕСЕ+МЕСА:

- мужа: при ОА и смешанной азооспермии – 78,1% против 50% при НОА;
- ДС – в половине циклов при НОА;
- их сочетание – при ОА и смешанной азооспермии (21,9%);

в криопротоколах: после микро-ТЕСЕ+МЕСА:

- ДС – в 100% с ОА и 47,2% – других ее типах;
- мужа – при НОА и смешанной азооспермией (47,2%)
- их сочетание – 11,1% – при НОА;

после ТЕСЕ+ПЕСА:

- мужа – 92,8% – при ОА и смешанной азооспермии, ДС – 14,3%.

Частота наступления беременности:

а) после микро-ТЕСЕ+МЕСА:

- в «свежих» протоколах 43,3% – при смешанной азооспермии и НОА и 25% – ОА;
- в криопротоколах: 100% – при ОА и 66,7% – НОА;
- в протоколах с размороженными сперматозоидами – в 33,3%.

б) после ТЕСЕ+ПЕСА:

- в «свежих» протоколах 92,8% – при НОА и смешанной азооспермии, 65,5% – при ОА;
- в криопротоколах: в пять раз чаще при ОА, чем при смешанной азооспермии.

Исходы программ ЭКО-ИКСИ:

- в «свежих» протоколах ЧИ после ТЕСЕ+ПЕСА – чаще, чем после микродиссекций: при ОА – практически в пять раз (53,6% против 11,1%), НОА – в два раза (42,8% против 23,3%) с сопоставимой частотой при смешанной азооспермии (21,5% в среднем); ЧНБ – более высокие показатели

после ТЕСЕ+ПЕСА – 54,7% в среднем против 41,5% при смешанной и НОА, и 25,0% при ОА после микродиссекции.

- в криопротоколах ЧИ после ТЕСЕ+ПЕСА при ОА практически втрое чаще, чем при смешанной (45,4% против 12,9%); микродиссекции – 38,0% в среднем; ЧНБ после ТЕСЕ+ПЕСА – в пять раз чаще при ОА (75,0% против 14,3% при азооспермии смешанной); после микро-ТЕСЕ+МЕСА – в 100% при ОА и 66,7% - НОА.
- в протоколах с размороженными сперматозоидами ЧИ при смешанной азооспермии после микродиссекции – 11,1% и ЧНБ – 25%.

Показатели ЧНБ в зависимости от типа азооспермии и варианта используемой спермы (мужа, донора, их сочетание), ее исходков:

- *Со спермой мужа:*
 - * при ОА – в «свежем» и криопротоколе – 67,5% в среднем;
 - * НОА – чаще в криопротоколах – практически в полтора раза (62,5% против 46,1% в «свежем»);
 - * смешанной азооспермии – в 2,3 раза чаще в «свежем» протоколе, чем в остальных (47,9% против 16,7% в среднем);
- *Со спермой донора:*
 - * при НОА – в полтора раза чаще в криопротоколе, чем «свежем» (62,5% против 45,2%);
 - * ОА – в криопротоколе (100%);
 - * смешанной азооспермии – в «свежем» протоколе (100%);
- *При сочетании вариантов спермы (при переносе одновременно по одному эмбриону от мужа и донора):*
 - *при НОА – в «свежем» и криопротоколе – по 100%;
 - *смешанной азооспермии – в «свежем» протоколе - 100%;

Репродуктивные потери отмечены только в «свежих» протоколах с тестикулярными сперматозоидами мужа: при НОА чаще, чем других типах азооспермии (19,2% против (5,4% в среднем).

Биохимические беременности чаще диагностированы при использовании:

- * ДС в ««свежем»» протоколе при смешанной форме азооспермии – в 7 раз (100% против 14,3%); в криопротоколе – 25% при ОА; сперматозоидов мужа – смешанной азооспермии (4,2%).

Влияние вариантов используемой спермы на ЧНБ в группах с различными методами получения сперматозоидов:

- в «свежем» протоколе со сперматозоидами мужа:
 - после микро-ТЕСЕ+МЕСА: при ОА – 25% против 38,5% – при других типах азооспермии;
 - после ТЕСЕ+ПЕСА: при НОА и смешанной – 100%, ОА – 70,4%;
- в «свежем» протоколе с ДС:
 - при смешанной азооспермии – в 100%;
 - НОА – чаще после ТЕСЕ+ПЕСА (100% против 41,0% при микро-ТЕСЕ);
- в протоколе с размороженными сперматозоидами:
 - мужа: после ТЕСЕ+ПЕСА: при ОА чаще, чем при смешанной азооспермии (75% против 16,7%); микро-ТЕСЕ – 62,5%;
 - мужа и донора при смешанной азооспермии – 33,3%.
 - их сочетание: после микро-ТЕСЕ+МЕСА – чаще при ОА, чем при НОА (100% против 62,5%).

Исходы беременностей:

- НБ – в «свежем» протоколе, вдвое чаще при НОА, чем других видах азооспермии (17,4% против 8,4%); трубная – только при НОА (4,3%);
- превалирование биохимических – в криопротоколе при ОА вдвое чаще (25% против 13,9%);
- большая частота живорождения при НОА – 100% в криопротоколе и с размороженными сперматозоидами; при смешанной азооспермии – в криопротоколе чаще, чем в «свежем» (100% против 77,8%) при обратном соотношении при ОА (75,0% против 90,5%);

- превалирование многоплодия – в протоколах со смешанной азооспермией – криопротоколе – все двойни (100%); при НОА – в «свежем» протоколе и криоциклах вдвое в сравнении с ОА (30% против 13,6%) – за счет двоен;
- частота многоплодия во всех протоколах доминировала при НОА (28,6% против 13,0%) с наибольшим удельным весом двоен (19,0% против 11,0% в остальных группах) и троен – вдвое чаще, чем при ОА (9,5%);
- показатель одноплодных родов составил 81,8% в среднем;

Исходы протоколов ЭКО-ИСКИ:

«Свежих» с нативными сперматозоидами: ЧИ – вдвое чаще при ОА (40,7% против 22,9%); ЧНБ – 50,8% в среднем;

Криопротоколов:

- ЧИ – наименьшая при смешанной азооспермии (12,9% против 41,9%);
- ЧНБ – превалирование при ОА (80%) – в 1,2 раза чаще, чем при НОА (66,7%) и практически в пять раз – при смешанной азооспермии (14,3%);

Повторных - с размороженными сперматозоидами:

- (беременность наступила только в группе со смешанной азооспермией); ЧИ – 11,1%, ЧНБ – 25%;

Во всех протоколах:

- ЧИ – наибольший удельный вес при ОА (40,8%), реже – в полтора и практически в два раза – 27% и 18,8% при НОА и смешанной азооспермии соответственно;
- ЧНБ – в трети протоколов при смешанной азооспермии и 57,1% в среднем – остальных типах.

Анализ особенностей раннего эмбриогенеза в протоколах ЭКО-ИКСИ:

- снижение удельного веса правильно оплодотворенных ооцитов (2PN), количество бластоцист высокого качества и эмбрионов для витрификации в группе НОА;
- нарушения в структуре СинК влияют на ЧНБ и репродуктивные исходы протоколов ЭКО-ИКСИ, отсутствие беременности при наличии:

- мейотической катастрофы – в группе с ОА – 66,7%;
- фрагментации СинК – при смешанной азооспермии – 25,0%;
- блока на стадии пахитены: при НОА – 22,2%; смешанной азооспермии – 50%; ОА – двух типов – непосредственно пахитенного ареста – (83,3%) и нарушения формирования полового тельца (66,7%).

ЧНБ при использовании в парах нативных свежеполученных сперматозоидов мужчин с генетическими мутациями:

- микроделецией AZFc региона Y-хромосомы: при НОА – в 16,7%; смешанной азооспермии – в 100%;
- полиморфизмами гена *CFTR*: при НОА – в 33,3%, смешанной азооспермии – в 100%, ОА – в 50%;
- полиморфизмы гена *AR*: при ОА – в 100%.

Особенности исходов программ ЭКО и ЭКО-ИКСИ в парах при наличии у мужчин избытка массы тела и ожирения:

- эмбриологические при ожирении – снижение частоты оплодотворения (ЧО), количества blastocyst, в т.ч. высокого качества;
- снижение ЧНБ (в сравнении с группой нормовесных мужчин) – 37,0% при ИзБМТ и 21,7% с ожирением – против 57,6% в парах с нормовесными мужчинами.

ГЛАВА 7

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мужское бесплодие остается актуальной медико-социальной проблемой, с неоднозначными лечебно-диагностическими подходами, особенно при тяжелых формах патозооспермии [3,28,74].

Причинами низкой реализации биологического отцовства у мужчин с различными типами азооспермии является не только отсутствие четких представлений об этиологии и патогенезе, но и недостаточный объем обследования [17,31,49]. Определение сперматогенеза как сложного многоэтапного процесса, контролируемого каскадом генов, запускающих деление сперматогониев, процессы мейоза и спермиогенеза объясняет несостоятельность исключительно рутинных методов в диагностике генеза спермиологических нарушений [6]. Общеизвестно, что дифференциация типов азооспермии базируется на гистологическом анализе тестикулярной ткани, а нарушениям эндокринной регуляции мужской репродуктивной системы отведена вспомогательная роль.

Виток развития современной биологии позволяет формировать представления о генезе механизмов нарушения дифференцировки, развития и созревания сперматозоидов не только на тканевом уровне, но и на ультраструктурном – ввиду обусловленности срывов сперматогенеза генетически детерминированными или экзогенными факторами [65]. Расширение диапазона диагностических возможностей с развитием молекулярно-генетических методов исследований способствовало выяснению причин тяжелых нарушений сперматогенеза на геномном и постгеномном уровнях [16,30,34]. Картирование отдельных генов и генных сетей, определяющих индукцию белков контроля функции гамет, показало сопряженность их мутаций с нарушением регуляции сперматогенеза на различных его этапах, как и гонадной гормональной активности [295].

Раскрытие особенностей генеза различных типов азооспермии достигается уточнением дефектности ультраструктур сперматозоидов и генетического аппарата с оценкой «состоятельности» белково-генных взаимодействий при использовании геномной протеомики и транскриптомных технологий [90,307]. Влияние на репродуктивную функцию мужчин с азооспермией носительства полиморфизмов гена *CFTR* и *SAG*-полиморфизма гена андрогенового рецептора (*AR*), делеций в *AZF*_{a,b,c} локусах *Y* хромосомы дискутабельно и сводится к фрагментарному анализу аспектов проблемы [73,141].

Микроделеции длинного плеча *Y*-хромосомы (делеции *AZF* - azoospermia factor, фактор азооспермии), выявляемые с частотой 1: на 1000-1500 мужчин, считают одной из наиболее частых генетических причин тяжелых форм нарушения сперматогенеза. Данные о корреляции между типом *AZF*-делеций, стадией и степенью нарушения сперматогенеза, прогностической значимости мутаций гена для экстракции сперматозоидов из тестикул и исходов их использования в программах ВРТ неоднозначны [63,214,218]. Обсуждается степень нарушения/сохранности сперматогенеза в зависимости от характера структурной перестройки, ее размера и локализации в регионах *Y*-хромосомы [106]. Перспективы молекулярно-генетического анализа – уточнение не только генеза МБ, но и прогноза влияния степени нарушения на исходы ВРТ [87].

Эффективность тестикулярной биопсии как инструмента диагностики причины азооспермии и предиктора исходов ВРТ дискутируется. Выбор в пользу микродиссекции семенных канальцев объясняют минимизацией интраоперационной травмы, осложнений и дистрофически-атрофических состояний, усугубляющих состояние гипогонадизма, при получении необходимого для оплодотворения и исследований объема ткани [252].

В качестве предикторов успешного извлечения сперматозоидов из яичек/придатков наряду с кандидатными генами обсуждаются: концентрация сывороточного тестостерона, соотношение тестостерон/эстрадиол, уровни

ФСГ, ингибина-В, объем яичек, дооперационная гормональная терапия, наличие в анамнезе орхита и оперативного вмешательства [256].

Вопросы предоперационной гормональной подготовки изучают с позиций возрастания шансов экстракции сперматозоидов, как и коррекции андрогендефицитного состояния у больных с НОА, синдромом Кляйнфельтера, однако мнения о возрасте начала терапии, препаратах, длительности курсов неоднозначны [17,47,272].

Возможность уточнения ультраструктурной полноценности гамет появилась с внедрением в практику метода ЭМИС, суть которого – распознавание недиагностируемых при рутинном оптическом микроскопировании субклеточных дефектов и целостности ДНК хроматина [7]. Нарушение структурной сохранности сперматозоидов, «зрелости» хроматина и его конденсации, нередко – генетически детерминированное, полагают сопряженным со снижением пенетрационных свойств мужских гамет и риском ранних репродуктивных потерь [226,230]. Данные о влиянии структурных аномалий зрелых сперматид на исходы ВРТ единичны, особенно – с позиций выбора методов лечения бесплодных мужчин с азооспермией [234,235,237].

Представляется перспективным дополнение рутинного блока обследований тестами на состояние СинК сперматоцитов I порядка, дефекты и/или нарушения формирования структур которого считают причиной угнетения сперматогенеза, с образованием незрелых половых клеток – в зависимости от уровня блока [5]. Нераспознанные дефекты мейотической конъюгации, рекомбинации и десинапсиса гомологичных хромосом в профазе I мейоза, обусловленные нарушениями в уникальной структуре СинК могут оказаться причиной отсутствия беременности или ее необъяснимых потерь. Риск анеуплоидии и передачи генетических дефектов потомству в отсутствие механизмов селекции структурно неполноценных сперматозоидов реализуется в дефектном формировании СинК, подтверждая целесообразность комплексного обследования мужчин с азооспермией.

Синдром Клайнфельтера (47,XXY) остается одной из обсуждаемых проблем ввиду противоречивости данных о медикаментозной коррекции андрогендефицитного состояния и предикторах эффективного извлечения сперматозоидов при микродиссекции. СК является наиболее частой ХА при бесплодии (3-4%) и встречается у 10% мужчин с НОА [66,284].

Гипергонадотропный гипогонадизм и азооспермия обусловлены тестикулярной деструкцией, сопровождаемой обширными полями фиброза и гиалинизированными семенными канальцами [175]. Удельный вес мозаицизма (47,XXY/46,XY) при СК составляет 10-20%, обуславливая слабо выраженную симптоматику неполной маскулинизации при большей вероятности выявления сперматозоидов в эякуляте в сравнении с немозаичной формой [44]. Молекулярный уровень организации биологических систем у мужчин с СК дискутируется наряду с возможностями медикаментозной коррекции дисгормональной регуляции [66,89].

Данные об ассоциации СК с AZF-микроделециями противоречивы: одни исследователи отрицают значимость «выпадений» в локусе AZFc как предикторов фенотипа мужчин с ХА и азооспермией, другие указывают на взаимосвязь характера гистогенеза с типом мутаций [44,163,280]. Эффективность экстракции сперматозоидов (до 50%) выступает основанием для отрицания представлений об абсолютном бесплодии контингента таких мужчин. Попытки уточнения прогностических факторов извлечения тестикулярных сперматозоидов оказались малоэффективными ввиду признания их субъективизма, однако возрастание шансов на успех связывают с микрохирургическими манипуляциями в более раннем возрасте ввиду остаточной активности функции клеток Лейдига и наличия редких очагов завершеного сперматогенеза. Сообщение о рождении здоровых с нормальным кариотипом детей от мужчин с СК указывает на благоприятную возможность реализации ими отцовского потенциала [134].

Передачу генетического риска потомству от мужчин с СК связывают с возрастанием содержания анеуплоидных сперматозоидов в результате ошибок мейоза, индуцированных эндокринной аутосистемой яичка [89].

Активно дискутируются патофизиологические механизмы, ведущие к фрагментации ДНК сперматозоидов, повышенный уровень которой связывают с трудностями оплодотворения, имплантации и ранними репродуктивными потерями [2,29,35,43,67,93,95]. Увеличение удельного веса мужчин с ожирением в структуре бесплодного брака объясняет интерес к анализу его влияния на семиологические параметры [55,185,287]. Рассматривается взаимосвязь большей встречаемости азооспермии или олигозооспермии у мужчин с избыточной массой тела и ожирением [57, 71].

Исследование геномной целостности и функциональной состоятельности сперматозоидов мужчин с ожирением полагают значимой с позиций взаимосвязи между аномальным ИФ ДНК сперматозоидов и повышенным ИМТ, эффективностью программ ЭКО и риском «трансляции» генетического материала потомству [160,237]. Данные о корреляции повреждения ДНК сперматозоидов с неблагоприятными репродуктивными исходами противоречивы [91,118,128,189,227,283]. Дискутируются пороговые значения ИФ, определяющие ухудшение оплодотворяющей способности спермы – от 22,3% до 30% [262,265].

Очевидна необходимость усовершенствования алгоритма ведения бесплодных мужчин с азооспермией, патозооспермией и избытком массы тела с целью выявления спектра повреждений на гонадном уровне, реализуемого только при комплексном подходе, с обоснованной коррекцией репродуктивных нарушений (в качестве предоперационного этапа - до экстракции сперматозоидов из тестикул) и дифференцированным выбором современных технологий преодоления МБ.

Использование возможностей инновационных технологий, основанных на оплодотворении *in vitro*, открывает перспективы преодоления МБ на

основании уточнения его генеза и персонализированной реабилитации в программах ЭКО, особенно при наличии избыточной массы тела и ожирения.

В соответствии с поставленными целью и задачами обследовано 905 семейных пар, обратившихся в отделение ВРТ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России с целью уточнения генеза МБ, выявленного ранее или впервые диагностированного избытком массы тела.

Анализ распределения бесплодных мужчин по возрастным категориям показал следующую зависимость: представители с НОА оказались моложе (20-34 года), чем с ОА (35 лет и старше), с верхней отметкой в «45 лет и старше». Меньший средний возраст представителей с НОА объясняется преимущественно первичным типом бесплодия и более ранней утратой репродуктивного потенциала. Высокая частота бесплодия интервалом в «два года» в группе с НОА контрастировала с показателем длительности в «5-10 лет», поднимая вопрос адекватности используемых лечебно-диагностических мероприятий и необоснованного удлинения обследования. Преобладание вторичного бесплодия при ОА и смешанной азооспермии объясняется суммой накопленных заболеваний и этиологически значимых анамнестических факторов. Представители с ИзбМТ и ожирением, испытывающие сложности с зачатием, оказались старше нормовесных мужчин, что указывает на резкое негативное влияние на эндокринную функцию и фертильный потенциал повышенной массы тела в старшей возрастной группе.

Наибольший показатель среднего ИМТ при ОА следует рассматривать с позиций анализа влияния на состояние ДНК тестикулярных сперматозоидов, ассоциированного с ожирением гормонального дисбаланса и окислительного стресса [185,287]. Представления об отрицательном влиянии токсикантов на сперматогенез ввиду развития окислительного стресса и риска избыточной фрагментации ДНК обязывают к преодолению никотиновой зависимости – в выборке мужчин с НОА и ОА как оздоровительного компонента терапии при бесплодии [81,119,196].

Показатель оперативных вмешательств на органах мужского репродуктивного тракта, наибольший при смешанной азооспермии, анализируется с позиций последствий хирургической травмы – риска развития рубцовых процессов и обструкции семявыносящих путей.

Высокая частота вмешательств, меняющих структуру и топографию органа (низведение яичек при крипторхизме – паховая ретенция у 14,1% мужчин со смешанной азооспермией и НОА, лечение гнойного эпидидимита – 12,7% с ОА, биопсии тестикул и их придатков – 12,7% в группе смешанной азооспермии) отмечена во всей выборке. Подобные наблюдения согласуются с мнением, что любое хирургическое вмешательство на органах репродуктивной системы повышает риск МБ – в выборке у 43,5% [115,126]. Следовательно, непроходимость семявыносящих протоков в исходе хирургической коррекции паховых грыж мужчин с ОА может стать потенциальной причиной infertility. Отсутствие эффекта от вмешательств по поводу варикоцеле у всех мужчин с ОА и большинства с НОА, восстановления проходимости семявыносящих путей с целью спонтанного появления сперматозоидов в эякуляте объясняет неоднократное участие контингента в протоколах ЭКО-ИКСИ. Однако полагаем возможным согласиться с мнением о целесообразности «оперативного» этапа как предшествующего биопсиям яичек и их придатков [158].

Высокая частота соматической заболеваемости у мужчин с азооспермией за счет болезней органов пищеварения, дыхания и мочеполовой системы позволяет рассматривать ее в контексте индуктора нарушений нейроэндокринной регуляции или фоновых процессов для развития хронических воспалительных процессов гениталий.

Многообразие факторов, отрицательно влияющих на сперматогенез, начиная от перенесенного в детстве эпидемического паротита, варикоцеле и крипторхизма до «воспалительного анамнеза» представителей с ОА и смешанной азооспермией подчеркивает полиэтиологичность МБ,

потребность в дифференцированном и своевременном выборе лечебно-восстановительных мероприятий.

Частота азооспермии в выборке с МБ (14,5%) соответствовала приводимым в литературе данным (10-15%)[104]. Итогом комплексного лабораторно-инструментального обследования мужчин с азооспермией стала констатация присущих различным типам азооспермии эндокринно-метаболических особенностей и параметров тестикул. Градация особенностей ГТ-ГФ-ГО позволила установить наличие гипогонадизма у представителей с ОА на фоне нормогонадотропного состояния, вариабельность эндокринного статуса – при смешанной азооспермии и НОА.

Полученные нами данные позволяют согласиться с утверждением об отсутствии реальных прогностических факторов эффективности экстракции сперматозоидов из яичек и их придатков [222]. Вариабельность объема яичек – констатация наряду с гипотрофией у 10,5% представителей с ОА и гипоплазии – только при НОА у четверти подтверждает их низкую предиктивную значимость для оценки активности сперматогенеза.

Гистологическая гетерогенность ткани яичек с очагами сохраненного сперматогенеза прослеживалась при различном эндокринном статусе мужчин с НОА. Различная ГТ-ГФ гонадная активность при азооспермии (при смешанной форме гипо- и нормогонадотропное состояние на фоне гипогонадизма) подтверждает сложности выявления маркеров активности сперматогенеза. Гистологический «мозаицизм» яичка в пределах одного семенного канальца даже при СКС отмечали также и другие авторы [225].

Подтверждение причастности к генезу ОА и смешанной азооспермии микробной колонизации генитального тракта сформировалось из «воспалительного» анамнеза и высокого диагностического титра уреоплазм, гарднереллы, ВПГ2 – в эякуляте/секрете простаты бесплодных мужчин со смешанной азооспермией и ОА.

Рекомендуемое исключение генетических аномалий в кариотипе бесплодных мужчин с тяжелыми формами патозооспермии [83] позволило

установить высокую частоту полиморфизма хромосом при НОА (10,5%) (изменение размеров гетерохроматиновых участков хромосом 9p^h+, 22p^s+ и изоцентрическая Y хромосома по короткому плечу с точкой разрыва в области Yq11). Большая частота при гипер- в сравнении с нормогонадотропной азооспермией частоты ХА не противоречит приводимым в литературе данным (20,2% против 4,9%)[82].

Полученные нами результаты согласуются с данными о наличии ХА у 14,4-15,2% мужчин с азооспермией и 2,3% – без таковой, риске передачи несбалансированных транслокаций (1% при НОА и 3,8% - других типах азооспермии) [83,85].

Обоснованность генетического скрининга при азооспермии подтверждает суммарное количество числовых и структурных аномалий аутосом и половых хромосом в кариотипе мужчин с НОА (17,1%)[228], немозаичной формы синдрома Кляйнфельтера, преобладающих при гипергонадотропной азооспермии, согласно литературным данным.

Суть генетического тестирования при азооспермии – не только в детерминации дефектности сперматозоидов отклонениями в кариотипе бесплодных мужчин, но и прогнозировании возможностей реализации биологического отцовства в программах ЭКО-ИКСИ наряду с наследованием генетических «рисков» [53]. Очевидно, что ориентир при первичном клинико-лабораторном обследовании бесплодных мужчин на показатели гипофизарных гормонов и тестикулярный объем как на «инструменты» градации типов азооспермии и целесообразности углубленного генетического скрининга перспективен только при «крайних» позициях параметров – гипопластичных яичках мягкой консистенции и повышенных показателях ФСГ и ЛГ. Подобные представления не противоречат заключениям других авторов [129,141].

Утверждение, что только гистологическое исследование выступает основанием для постановки диагноза азооспермии [52,250] реализовано на практике с выделением различных ее форм. Полученные нами данные об

эффективности экстракции сперматозоидов с помощью ТЕСЕ и микро-ТЕСЕ не отличались от приводимых в литературе [99,209]. Преимущество использования микро-ТЕСЕ при НОА согласуется с результатами исследований других авторов [195].

Следует отметить, что прогнозирование успешности экстракции сперматозоидов на основании уровней ФСГ, ингибина В, тестостерона и объема яичек оказалось малоэффективным, согласно данным других авторов [188]. Вероятность выявления сперматозоидов при гипосперматогенезе оказалась выше в сравнении с остальными вариантами гистологических заключений [268]. Исключение генетических дефектов контроля сперматогенеза и перенос в программах ЭКО-ИКСИ здоровых эмбрионов предполагает комплексное обследование бесплодных мужчин с азооспермией – кариотипирование и молекулярно-генетический анализ локусов генов *AZF*, *CFTR* и *AR*. Представления о взаимосвязи тяжелых форм патозооспермии со значительной частотой мутантных генетических полиморфизмов базируется на наибольшей встречаемости микроделеций *AZF* региона при НОА (25,7%), реже – при смешанной азооспермии (11,4%). Подобные показатели не противоречат данным о вариабельности микроделеций Y-хромосомы при азооспермии в пределах 1,0-55,5% ввиду этнической неоднородности [108,306].

Детализация типа и протяженности (частичные или полные) микроделеций указала на их высокую встречаемость в выборке бесплодных мужчин, согласно данным литературы [216], с преобладанием варианта *AZFc* (14,7%) при НОА и смешанной азооспермии. Выявленная индукция тяжелого угнетения сперматогенеза в присутствии микроделеций локусов *AZFb/b,c* при НОА (8,6%) подтверждается исследованиями других авторов [115].

Микроделеции типа *gr-gr* локуса *AZFc* при НОА встречались в 6,7%, подтверждая их значимость как генетического маркера риска нарушения сперматогенеза в отличие от других авторов, как и варианта *b1/b2*, частота которого оказалась ниже (3,8%) [310]. Взаимосвязь указанных частичных

микроделеций со сперматогенной недостаточностью подтверждают результаты других авторов [212,309].

Данные по мутациям генов, выступающих триггерами отклонений в контроле сперматогенеза (7,9% при ОА, 39% – при НОА, 32,9% - смешанной азооспермии) с небольшой степенью вариабельности соответствуют научным данным [198], подтверждая суть проблемы ведения бесплодных мужчин: именно гиподиагностика инициирует ложные заключения об идиопатическом генезе азооспермии. Вклад в статистику генетических аномалий у лиц с бесплодием вносит исследование мутаций в гене *CFTR* (у 19,0% мужчин со смешанной азооспермией и 9,6% – другими ее типами за счет преобладания полиморфизма T7/T9 – 16,5%) и CAG - повторов в гене *AR*, что не отличается от данных других авторов [37,38].

Изучение функциональной активности репродуктивной системы мужчин с азооспермией позволяет выявить присущие отдельным генетическим полиморфизмам особенности: для делеции AZFb/b,c оказалось свойственно преобладание гипергонадотропного состояния, с гипогонадизмом – у 66,7% мужчин с НОА и гипоплазией тестикул. Прогностически значимый аспект: нормальная функция яичек отличала всех мужчин с ОА, независимо от типа генетических мутаций – *CFTR* и *AR*.

Несмотря на отсутствие корреляции носительства делеций AZFc локуса и мутаций гена *CFTR* с состоянием ГТ-ГФ-ГО системы бесплодных мужчин, подобный анализ в совокупности с оценкой объема яичек способствовал формированию представлений об особенностях эндокринно-метаболического фона при различных генетических полиморфизмах. Подобную тенденцию об отсутствии взаимосвязи между уровнем ФСГ как предиктором в скрининге микроделеций Y-хромосомы подтверждают другие исследователи [64,140].

Разрешению дискуссий о прогностической ценности молекулярно-генетического исследования с целью эффективности выявления сперматозоидов способствует выявление сопряженности носительства делеций субрегиона AZF b/b,c с отрицательным результатом пункций [159].

Положительный исход экстракции сперматозоидов методами микро-ТЕСЕ и ТЕСЕ+ПЕСА при ОА состоялся независимо от варианта генетических мутаций – *CFTR* или *AR*. Положение о перспективности экстракции сперматозоидов из яичек/придатков при микроделециях *AZFc* в сравнении с локусами *AZFa* или *AZFb* должно быть дополнено заключением о типе азооспермии: при НОА пригодные для использования в ВРТ гаметы выявляли в половине случаев, смешанной азооспермии – во всех. Наличие полиморфизмов САG-повторов более 25 гена *AR* у представителей со смешанной азооспермией определяло неэффективность биопсий тестикул.

Предиктивную ценность генетических полиморфизмов относительно гистологических характеристик биопсий яичек подчеркивало носительство делеций *AZFb/b,c* при НОА: у двух третей выявлен «Сертоли-клеточный синдром», трети – гипосперматогенез («4//6 баллов» за счет зон с единичными сперматоцитами и небольшим количеством ранних сперматид). Сопряженность микроделеций *AZFc* с вариабельностью патоморфологии – выявлением наряду с «клеточным арестом» зон гипосперматогенеза указывала на сохранность сперматогенного эпителия при отдельных блоках сперматогенеза на уровне ранних округлых сперматид [211]. Определена взаимосвязь СКС и полных делеций *AZFa* и *AZFb*, «частичных» – с различным сперматогенным фенотипом [57,63,72,145]. Подобные ассоциации подтверждают исследователи, отметившие выявление сперматозоидов у 39,5% мужчин с неполной микроделецией *AZFc-b2/b4* [61].

Исследование соотношения между «генотипом и фенотипом» показывает диагностическое и прогностическое значение идентификации *Yq* микроделеций с позиций возможности экстракции сперматозоидов [228]. Констатация гипосперматогенеза во всех образцах указывала на отсутствие индукции мутациями гена *AR* значительных повреждений семенных канальцев.

Гистологическая неоднородность тканей при наличии мутантных полиморфизмов гена *CFTR* и их сочетания с микроделецией *AZFc*

варьировала от полной аплазии герминогенных клеток и очагового СКС до участков с нарушением вызревания сперматид на ранних стадиях, как и зон с сохранными очагами сперматогенеза. Возможность выявления зрелых гамет при смешанной азооспермии и ОА, независимо от вариантов генетических мутаций свидетельствует о многофакторности механизмов угнетения сперматогенеза, возможно, дополнительных, после первичного повреждения ткани яичек и изменения функциональной активности клеток Сертоли [257]. Сложности обеспечения гистологического исследования биоптатов яичек определяются фрагментарностью забора материала - у 83,8% мужчин с НОА и 78% представителей остальных групп.

Выявленное снижение макроскопических параметров эякулята у мужчин с избытком массы тела соответствовало контексту представлений о взаимосвязи ИзбМТ с негативным влиянием на фертильный потенциал мужчин [287]. Сокращение его объема (уменьшение количества сперматозоидов в 1 мл), снижение доли морфологически нормальных гамет с быстрой прогрессивной подвижностью у представителей с ожирением. Результаты нашего исследования согласуются с мнением авторов, отмечавших подобные ассоциации [160].

Полученные нами данные о возрастании доли сперматозоидов с дефектными ультраструктурами – элонгацией головок и их микроформ, нарушений в шейке гамет согласуются с мнением, что избыточная конверсия в жировой ткани андрогенов в эстрогены и секреция адипокинов, регулирующих работу ГТ-ГФ-ГО оси, негативно влияет на сперматогенез [184]. Полагаем значимой отрицательную зависимость между повышенным ИМТ, концентрацией и общим количеством сперматозоидов в эякуляте, живых сперматозоидов, подвижностью и количеством морфологически нормальных гамет.

Возрастание доли сперматозоидов с удлинёнными головками у мужчин с ИзбМТ и ожирением требует исключения фрагментации ДНК вследствие низких показателей оплодотворения при ЭКО-ИКСИ [183]. Очевидна

необходимость реализации мероприятий по коррекции ИзбМТ и ожирения с нивелированием последствий предполагаемых причин аномального спермообразования: гипертермии яичек и оксидативного стресса [1,25,144].

Специфические изменения сперматозоидов мужчин с избытком массы тела соответствовали данным о связи ожирения с ультраструктурными нарушениями гамет – повреждениями акросомы и шейки, высоким ИФ ДНК с элонгацией головок и наличием микроголовок [54]. Возрастание при ИзбМТ и ожирении мужчин количества гамет с нарушениями в шейке связывают с ранними эмбриональными потерями [102].

Утверждение о влиянии фрагментации ДНК в головке спермиев на этапы раннего эмбрионального развития согласуется с предложением использовать ИФ как биомаркер при обследовании бесплодных мужчин и для прогнозирования исходов ВРТ, дополняющий рутинное спермиологическое исследование [95,107,119,259,261].

При высоком ИФ ДНК у мужчин с ожирением (практически у половины более 50%) тенденция к суммации ранних репродуктивных потерь (Б/хБ и НБ) не противоречила данным других авторов [43,284], показавших на пороговые значения индекса более 30% [265]. Отсутствие различий в ЧНБ при различном ИФ сперматозоидов согласуется с мнением об отсутствии влияния его повышенных показателей на эффективность оплодотворения [119].

Прогрессивное по результатам НВА-теста возрастание количества гиалуронан-связанных сперматозоидов при патозооспермии может свидетельствовать о нарушениях ремоделирования рецепторного аппарата гамет, риске фрагментации ДНК и анеуплоидий, что согласуется с заключениями других исследователей [223].

Выявленные коррелятивные связи значений НВА-теста и показателей спермограммы - концентрации, подвижности и морфологии соответствуют концепции большей способности сперматозоидов к преодолению кумулюса при преобладании фракции зрелых гамет с нормальной морфологией и

интактной ДНК, специальными рецепторами на головке и способностью к связи с гиалуронатом [120,121]. Выделение критериев спермиологического исследования к проведению НВА-теста позволяет осуществлять отбор гамет для ЭКО-ИКСИ с высокой оплодотворяющей способностью [136].

Развитие технологий ИКСИ и микро-ТЕСЕ сделало реальной возможность отцовства для мужчин с немозаичной формой СК [134,269]. Подтверждением тезиса выступают положительные результаты микродиссекций: диагностической с последующим замораживанием сперматозоидов у юноши 15 лет, как и пригодной для использования в циклах ЭКО-ИКСИ - у мужчины 22-х лет.

Показатель успешного извлечения зрелых сперматид при СК (у двоих из шести) согласуется с данными о вероятности получения сперматозоидов при микро-ТЕСЕ у мужчин с НОА и нормальным кариотипом (50%)[269].

Позиционирование молодого (до 35 лет) возраста в контексте фактора успешной экстракции сперматозоидов в ходе микродиссекции объяснимо с позиций концепции прогрессирующей деградации сперматогониев и снижения сперматогенеза при старении [202], однако полученные нами данные оспаривают однозначность подобной корреляции. С позиций решения актуального в теме ведения мужчин с СК вопроса о наиболее оптимальном возрасте извлечения сперматозоидов подтвердим большую эффективность микродиссекции яичек в подростковом и молодом возрасте. Невозможность экстракции половых клеток в более позднем возрасте позволяет опровергнуть мнение о сопоставимости показателей для мужчин молодого и старшего возраста [269]. Следует согласиться, что отсроченные попытки экстракции сперматозоидов в старшем возрасте производились исключительно вследствие запоздалой диагностики синдрома, вероятно, на фоне немозаичной формы [70,293]. Эффективность экстракции сперматозоидов при СК (33,3%) соответствовала приводимым в литературе данным – с разбросом в 21-72% [138].

Идентичность параметров объема яичек гормональному статусу мужчин с СК подтверждало отсутствие их прогностической ценности в отношении исходов микро-ТЕСЕ при соответствующем немозаичной форме фенотипе. Признаки гинекомастии при евнухоидных пропорциях тела и малом объеме яичек соответствовали высоким показателям ФСГ и ЛГ при низком/низконормальном уровне тестостерона, целесообразность использования которых в качестве предикторов наряду с уровнем ингибина В отрицается и другими исследователями [194]. Обращает внимание факт обнаружения сперматозоидов при пониженном уровне ингибина В и малом объеме яичек, допустимый, по данным литературы [251]. Следует опровергнуть данные о положительной прогностической ценности тестикулярного объема, уровня тестостерона и реакции на лечение ХГЧ как маркеров «успешной» микро-ТЕСЕ [243].

Диагностику СК следует признать отсроченной вследствие не только «масок» фенотипов, но и внимания к проблеме только с появлением жалоб на признаки андрогендефицитного состояния и бесплодие уже в зрелом репродуктивном возрасте [217]. Выявление в образцах тестикулярной ткани мужчин с СК извитых семенных канальцев с признаками тотальной дегенерации на фоне частичной или полной атрофии имеет объяснение подобного гистологического финала как исхода прогрессирующей инволюции сперматогониев с детства, массового фагоцитоза зародышевых клеток и замещения их клетками Сертоли, либо клеточными «теньями». Признание гистологического мозаицизма при СК – выявления наряду с участками гиалинизации семенных канальцев и тестикулярного фиброза структурных единиц с сохраненным сперматогенезом приведено в исследованиях и других авторов [203]. Полагаем возможным согласиться с утверждениями о потенциальном улучшении сперматогенеза при наличии его фокусов у мужчин с немозаичным СК после использования ИА – для снижения уровня эстрадиола и улучшения интратестикулярной доступности тестостерона [47].

Целесообразность генетического исследования эмбрионов, полученных в результате оплодотворения методом ИКСИ, объясняется фактом активного выживания клеток с редуцированной программой клеточной гибели, как следствие – возрастания риска передачи потомству хромосомных транслокаций и анеуплоидии сперматозоидов [83].

Возможность изучения изменений молекулярной организации СинК сперматоцитов I порядка, участков инактивации хроматина, рекомбинации, синапсиса позволила приблизиться к пониманию сути ремоделирования хромосом, обеспечивающих гаметам возможность прохождения процессов мейоза и прогнозу риска формирования анеуплоидных половых клеток [42]. Нарушение формирования полового тельца, незрелость его структуры выступает морфологическим признаком «пахитенного ареста», детерминирующего нарушения фертильности у представителей с ОА на молекулярно-генетическом уровне. Последствия пахитенного блока - образование незрелого полового тельца и ассоциация полового бивалента с аутосомой определяли возможность выявления зрелых гамет только при фрагментарном повреждении структур СинК, аналогично литературным данным [5,27].

Отсутствие взаимосвязи десинапсиса гомологов в профазе I мейоза с носительством хромосомных транслокаций при «пахитенном аресте» указывало на вероятность микротранслокаций аутосом. Инактивация единственной X-хромосомы во время мейоза может предотвращать повреждения в ходе рекомбинации за счет неспаренных участков. Частым проявлением мейотических нарушений у мужчин с азооспермией является выраженная в разной степени фрагментация хромосом. В части пахитенных ядер сперматоцитов I порядка определяли единичные фрагменты хромосом наряду с атипичной архитектоникой ядра и извитой формой СинК (15,2%).

Следствием блока сперматогенеза на стадии «зиготены-лептотены», чаще выявляемого при гипогонадизме, становится нарушение образования хромосомных бивалентов, пары гомологичных хромосом, формирующих

остов СинК, с выявлением мелких недифференцированных клеток и единичных дегенерирующих сперматоцитов, фрагментов осевых хромосом. Блок мейоза на стадии сперматогониев и «прелептотены-ранней лептотены» вследствие нарушений формирования связи хромосом с белковыми тяжами, «якорными» структурами для СинК связывают с дистрофией клеток Сертоли и зависимых от них клеток семенного эпителия – вероятно, генетически детерминированных.

Обусловленность МБ повреждениями структуры мейотических хромосом, процессов синапсиса, рекомбинации и десинапсиса гомологов в профазе I мейоза позволяет утверждать о необходимости комплексного обследования при азооспермии не только с целью уточнения генеза бесплодия, но и оценки генетических рисков переносимых эмбрионов.

Экстраполяция результатов цитогенетического исследования на состояние гонад в целом представляется необоснованной: вследствие частичных блоков сперматогенеза – наряду с встречаемостью ядер с атипичной структурой СинК или его фрагментацией, ассоциацией аутосом с половым бивалентом, нарушением формирования полового тельца, преждевременным десинапсисом половых хромосом существует вероятность выявления единичных зрелых спермиев. Вероятность экстракции единичных зрелых половых клеток позволяет судить об адекватности селекции многостадийного процесса сперматогенеза, не смотря на наличие ультраструктурных и молекулярных повреждений.

Поиск корреляционных связей между гистологической оценкой состояния гонад представителей с азооспермией и цитогенетической – СинК в сперматоцитах I порядка оказался несостоятельным. Отсутствие параллелей между «фенотипическими» и генотипическими особенностями проявилось в констатации гипосперматогенеза при всех типах характеристик СинК, за исключением когорты с блоком мейоза на стадии пахитены – за счет встречаемости образцов с «нормальным тестикулярным биоптатом».

Феномен мозаицизма при азооспермии реализуется не только на тканевом, но и на молекулярно-клеточном уровне. Наличие полноценного очагового сперматогенеза в «8-9 баллов» при ОА и смешанной азооспермии коррелировало с различными мейотическими нарушениями. Напротив, заключение о сохранности сперматогенеза в «9-10 баллов» оказалось присуще категориям мужчин с блоком на стадии пахитены, мейотической катастрофой, фрагментацией СинК. Согласно полученным нами данным, у мужчин с блоком мейоза на стадии пахитены гистологическая картина разнилась в зависимости от «объема» повреждений СинК – фрагментарном или тотальном в зависимости от силы фактора, первичности или вторичности воздействия. Подтверждение подобному заключению: выявление всей гистологической «линейки» – от зон с редукцией сперматогенеза до зрелых гамет и указания на блок мейоза на стадии пахитены у представителей с НОА. Следовательно, кариологическое исследование при НОА отражает многообразие вариантов деструктивных нарушений процессов синапсиса и рекомбинации хромосом в профазе I мейоза и их рисков, сопровождающих в большей степени представителей с НОА, при использовании зрелых сперматозоидов в циклах ВРТ без ПГД.

Наиболее однозначная интерпретация гистологического профиля при НОА оказалась свойственна представителям с атипичной архитектоникой ядра при исследовании СинК. Заключение о блоке на стадии зиготены, выявленное у представителей с НОА, следует отнести к отрицательным предикторам экстракции сперматозоидов. Эндокринный профиль представителей с азооспермией с позиций поиска предикторов кариологической деструкции позволил выявить ряд параллелей. Развитие клеточных дегенеративных процессов – мейотической катастрофы и нарушения формирования полового тельца у представителей с ОА превалировало в присутствии гипогонадизма.

Вероятность микрокариологических нарушений (блока мейоза на стадии пахитены) даже при нормальном тестикулярном объеме

представителей с НОА на фоне гипергонадотропного состояния указывало на несостоятельность лечебно-диагностических подходов при азооспермии в отсутствие оценки состояния СинК. Подтверждением отсутствия корреляции объема гонад и гипофизарно-гонадного профиля с состоянием кариологических структур сперматозоидов выступала сопряженность нормальной функции яичек с различными блоками сперматогенеза – на стадии лептотены, допускающей возможность экстракции гамет, и зиготены – прогностически неблагоприятного маркера редукции образования половых клеток на стадии ранних сперматид [191].

Повреждения архитектоники мейотических ядер мужчин с НОА при гипогонадотропном гипогонадизме возможно рассматривать как исход нарушений трофики яичка. Ориентация на особенности ГТ-ГФ-ГО статуса представителей с азооспермией в сочетании с результатами морфологического исследования тестикулярных образцов и оценки состояния СинК сперматоцитов I порядка позволяла отслеживать их корреляцию с ЧНБ. Констатация ее при заключении о кариологической несостоятельности сперматоцитов I порядка – мейотической катастрофе и нарушении формирования структуры полового тельца на фоне нормогонадотропного гипогонадизма подтверждала сохранность у части сперматозоидов полноценных структур СинК. Аналогичная тенденция прослеживалась при блоке мейоза на стадии лептотены у мужчин без нарушений тестикулярной функции. Напротив, атипичную архитектуру ядра и блок на стадии зиготены у мужчин с гипо- и гипергонадотропными состояниями рассматривали как предиктор бесплодия. Очевидно, подобные кариологические повреждения захватывают большой пласт сперматозоидов, причем их степень определяется силой воздействующего фактора.

Корреляция «пахитенного ареста» с различными гистологическим и гормональным профилем мужчин с азооспермией не позволяет рассматривать подобную характеристику СинК как предиктивную для наступления беременности. Следовательно, различные признаки нарушения

синапсиса, рекомбинации и десинапсиса хромосом при исследовании СинК мужчин с азооспермией позволяют прогнозировать риск хромосомных транслокаций в мейотических ядрах и анеуплоидии сперматозоидов и осуществлять дифференцированный подход к выбору методов преодоления мужского бесплодия.

Востребованность методов изучения спермиологических особенностей бесплодных мужчин с азооспермией на субклеточном уровне объясняется фактами наибольшей способности к оплодотворению сперматозоидов с нормальной формой ядра, зрелостью хроматина и морфологически полноценными органеллами [9,102]. Наименьшее количество отклонений в ультраструктуре сперматозоидов оказалось свойственно представителям с ОА. Отличительными характеристиками ультраструктурного анализа сперматозоидов мужчин с НОА являлось высокое их содержание с недостаточно конденсированным - незрелым хроматином (НХ) (менее 30%) [7,80]. Появление и прогрессивное возрастание «гранулярного» хроматина, который достигает плотной, компактной консистенции при превращении округлых сперматид в удлинённые, с заменой основных белков гистонов на протамины выступает маркером состоятельности ядерного материала [21,147].

Прослеживается связь высокого содержания аномального хроматина с риском хромосомных aberrаций гамет, снижением оплодотворяющей способности сперматозоидов и риском ранних репродуктивных потерь [125,130]. Подобного мнения придерживаются авторы, указавшие на большую частоту спонтанного прерывания беременности при содержании сперматозоидов с подобной морфологией свыше 30% [7]. Тенденция к большей дефектности при НОА клеточных структур сперматозоидов (акросомы атипичного строения, вакуолизация хроматина, снижение количества интактных головок) позволяет предположить высокую коррелятивность морфологических особенностей сперматозоидов и состояния его генома [26,33].

Отсутствие зрелых фракций гамет при гистологическом варианте синдрома «только клеток Сертоли» за счет блока сперматогенеза у мужчин с НОА соответствовало концепции «фокусного» сперматогенеза, что согласуется с данными других исследователей [132].

Высокий бактериологический индекс при смешанной азооспермии соответствовал фактам лейкоспермии, хроническим воспалительным процессам в мужском репродуктивном тракте в анамнезе. Колонизация условно-патогенной флорой практически не отражалась на ультраструктурном уровне в отличие от более частой встречаемости нарушений процессов конденсации хроматина при персистенции вирусной инфекции (ВПГ2).

Преобладание у большинства представителей с НОА многослойной базальной мембраны, с инвагинациями в цитоплазму прилежащих клеток семенного канальца, оказалось свойственно всем носителям делеций AZF зоны Y-хромосомы. Причиной ее гиперплазии полагают повреждение, обуславливающее изменение физико-химических свойств – текучести и мембранного потенциала. Эксцентрическое расположение органелл – их смещение в хвостовом направлении за счет гиперплазии ядерной мембраны способствует ограничению подвижности сперматозоида. Механическую прочность базальной мембраны определяет один из ее компонентов – коллаген IV «сетевидного» типа, формирующий путем самосборки пластинчатые структуры, которые связываются с сетью ламининов непосредственно или через нидогеновые мостики. Очевидно, что деструктивные процессы в области базальной мембраны, белки которой регулируют динамику реструктуризации контактов гематотестикулярного барьера через взаимодействие коллагена, протеаз и ингибиторов протеаз, возможно с участием цитокинов, могут нарушать движение дифференцирующихся половых клеток, исходом которого является формирование зрелых сперматид. Возможно, формирование многослойных базальных мембран и их производных является компенсаторной реакцией в

ответ на нарушение регуляции сперматогенеза – ввиду отсутствия ответной реакции сперматогониев на гонадотропные гормоны.

Проапоптическая направленность отдельных гамет характеризовалась деструкцией тонкогранулярного хроматина сперматид ранних стадий и накоплением липидных гранул, подтверждая мнение о необходимости изучения структурно-функциональной целостности субклеточных органелл сперматозоидов, экстрагируемых с целью использования в протоколах ЭКО-ИКСИ [111,114]. Очевидно, что прогнозирование исходов программы ЭКО-ИКСИ требует не только традиционного спермиологического исследования, но и ультраструктурного – для оценки пенетрационной и оплодотворяющей способности сперматозоидов. Возрастание аномалий ультраструктур и органелл сперматозоидов в присутствии микроделеций локусов *AZF* и полиморфизмов гена *CFTR* отмечали, определяя перспективность дальнейших исследований. Следовательно, постулирование концепции учета всего спектра репродуктивных «поломок» на микроуровне возможно исключительно в условиях комплексного обследования бесплодных мужчин с азооспермией.

Итоговый анализ поиска предикторов выявления сперматозоидов при пункциях гонад показал отсутствие значимой роли уровней ФСГ, ЛГ, ингибина В, Тест, эстрадиола и их соотношения, объема яичек, микроделеций локуса *AZFc*, мутантных полиморфизмов *CFTR*, их сочетания, полиморфизмов гена *AR* и прогностической – гипосперматогенеза по данным биопсии гонад и медикаментозной подготовки. Эффективность заместительной гормональной терапии препаратами тестостерона мужчин с азооспермией подтверждают исследования отечественных авторов [10].

Анализ исходов программ ЭКО-ИКСИ позволил выявить, что наибольшее количество «свежих» протоколов, независимо от метода получения сперматозоидов состоялось в группе со смешанной азооспермией, при ОА – после процедуры ТЕСЕ вдвое больше, чем после микро-ТЕСЕ. Невысокий показатель свежих протоколов в группе с НОА объясняется

значительным количеством отказов от ПЭ и вступлением в криопротоколы, удельный вес которых оказался наибольшим при смешанной азооспермии.

Частота протоколов с размороженными после витрификации сперматозоидами оказалась сопоставимой с таковой «свежих» – при ОА и уступала вдвое – при смешанной азооспермии. Причины невозможности/отказов от ПЭ в протоколах ЭКО-ИКСИ при ОА оказались этиологически predetermined за счет выявления инфекций урогенитального тракта (у трети мужчин), низкого качества ооцитов и эмбрионов. При смешанной азооспермии отказы объяснялись субъективизмом представителей – нежеланием использования ДС, при НОА – наряду с аналогичной причиной синдрома гиперстимуляции яичников.

Использование ДС в свежих протоколах ЭКО-ИКСИ объяснялось неэффективными манипуляциями микро-ТЕСЕ и ТЕСЕ+ПЕСА – в половине случаев. Сочетанное применение сперматозоидов мужа и донора в протоколах с размороженной спермой – при смешанной азооспермии и ОА оказалось обусловлено невысокими характеристиками размороженных гамет ввиду многофакторности генеза заболевания.

Различие показателей ЧНБ при экстракции тестикулярных и эпидидимальных сперматозоидов, со значительным превалированием после ТЕСА+ПЕСА в сравнении с микро-ТЕСЕ обусловлено повреждающим воздействием с реализацией на органном и ультраструктурном уровнях. Вероятность успешной имплантации на ПЭ оказалась наименьшей в группе с НОА и смешанной азооспермией, что прогнозируемо с позиций сниженных показателей нормально оплодотворенных ооцитов (2PN) и образования бластоцист высокого качества. ЧНБ в «свежем» протоколе оказалась наибольшей при сочетанном использовании СМ и ДС, при меньших показателях в группе с НОА, что согласуется с данными литературы [132]. Большая ЧИ на ПЭ в «свежих» протоколах ЭКО-ИКСИ при ОА в сравнении с другими типами азооспермии доказана исследованиями ряда авторов. Невысокую в сравнении с популяционной ЧНБ при всех типах азооспермии,

особенно – НОА можно объяснить высокой частотой аномалий – на хромосомном и ультраструктурном уровне. Риск рождения в парах с азооспермией детей с ХА подтверждает целесообразность ПГД и пренатальной диагностики плода.

Высокий показатель использования при НОА и смешанной азооспермии ДС приводит к высокой частоте родов с суммарно высоким показателем многоплодных беременностей (за счет двоен и троен), в криопротоколе – при смешанной азооспермии оказались созвучными отмеченным ранее фактам.

Выявленное нами преобладание репродуктивных потерь (Б/хБ, НБ и ТБ) в «свежем» протоколе при НОА, Б/хБ – в криопротоколе при ОА соотносится с наблюдениями других авторов [179,258].

Полученные нами данные о влиянии аномалий СинК на ЧНБ и ее исходы соответствовали следующим тенденциям: завершение родами беременностей при ОА подтверждало фрагментарность нуклеарных повреждений – при выявлении признаков мейотической катастрофы и нарушении формирования полового тельца. Указание на «пахитенный арест» определяло низкую вероятность беременности или тенденцию к регрессу в парах с ОА – родами завершились все беременности, за исключением представителей с данной патологией СинК, как и при смешанной азооспермии – у половины с фрагментацией СинК. Следовательно, наличие отдельных аномалий СинК позволяет утверждать об их предикторной роли в генезе не только infertility (блок на стадии зиготены), но и невынашивания: заключение о «пахитенном блоке» у половины с НОА и 16,7% – смешанной азооспермией индуцировало НБ.

Выявление подобных ультраструктурных особенностей выступало объяснением генеза бесплодия или невынашивания в парах с выявлением «внешне нормальных» удлинённых сперматид с конденсированным хроматином, потенцируя вектор научного поиска в фокус поиска повреждений при азооспермии на молекулярно-клеточном уровне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Актуальность проблемы распространенности мужского бесплодия объясняется как неутешительной статистикой его роста, так и открывающимися возможностями изучения его генеза на современном молекулярно-генетическом уровне.

Установлена обусловленность отдельных нарушений сперматогенеза у мужчин с азооспермией наличием структурной перестройки хромосом, вплоть до резкого угнетения репродуктивной функции, в отсутствие должного объема обследования, интерпретируемого как идиопатическое бесплодие. Определено, что вклад в развитие мужской инфертильности, как и в исходы микроманипуляций на гонадах вносит наличие отдельных генетических аномалий – мутаций в гене *CFTR* и микроделций *AZF* локусов Y хромосомы.

Научно-исследовательский интерес к проблеме фертильности мужчин с Синдромом Кляйнфельтера возрос с появлением заключений о возможности реализации ими репродуктивной функции с помощью персонализированных технологий обследования и лечения. Несмотря на факты, подтверждающие возможность экстракции сперматозоидов из гонад мужчин с немозаичной формой СК, показатели частоты наступления беременности в последующем остаются невысокими, что и было продемонстрировано в нашем исследовании.

Многокомпонентность сперматогенеза, понимание сложности регуляции которого состоялось благодаря результатам научно-исследовательской деятельности в области генетики и молекулярной биологии, симбиоза геномики и протеомики, определила вектор научных поисков для бесплодных мужчин с тяжелой патозооспермией, в частности – секреторной (необструктивной формой) азооспермией.

Результаты нашего исследования подтверждают, что средоточие внимания специалистов исключительно на оценке гормонально-

метаболического профиля при азооспермии не позволяет сформировать полного представления о патогенетических механизмах заболевания.

Понимание детерминированности характера/степени угнетения сперматогенеза различными видами частичных/полных/сочетанных мутаций субрегионов AZF локуса Y хромосомы подтверждено для отдельных видов мутаций, однако степень корреляции таковых с ультраструктурной и тканевой «несостоятельностью» гонад изучена недостаточно.

Прогностическая ценность «тонких» методов исследований – электронно-микроскопического исследования сперматозоидов (ЭМИС) – особенно важна для категории мужчин с тяжелым нарушением сперматогенеза – выраженной олигоастенотератозооспермией. Полагаем, что этот метод более надежен в определении нарушений ультраструктуры мужских гамет в сравнении с рутинной световой микроскопией, как и оценка состояния синаптонемных комплексов (СинК) в распластанных ядрах сперматоцитов I порядка. Дополнительным преимуществом введения данных методов исследований в диагностический алгоритм обследования мужчин с азооспермией является возможность уточнения причин снижения эффективности эмбриологических этапов – частоты оплодотворения, имплантации, образования бластоцист высокого качества и клинических исходов – наступления клинической беременности, ранних репродуктивных потерь. Уточнение объема повреждений – аномалий конъюгации, рекомбинации и десинапсиса гомологичных хромосом в профазе I мейоза при исследовании СинК позволит предположить риск передачи потомству мужского пола нарушений спермато/спермиогенеза и, возможно, хромосомных анеуплоидий. Сопоставление исходов лечения с имеющимся носительством мутантных аллелей генов *CFTR*, полиморфизмом САG-повторов гена *AR*, делеций в AZF регионе Y-хромосомы, дефектов ультраструктуры при ЭМИС позволит приблизиться к раскрытию проблемы тяжелых форм нарушения сперматогенеза. Формат обследования с оценкой рисков репродуктивных неудач на геномном и постгеномном уровнях

позволит разработать тактику ведения контингента с азооспермией со своевременным выбором в пользу ДС при констатации значительных структурно-функциональных дефектов гонад - тотальности повреждений.

Не менее важной проблемой в эндокринологии репродукции выступают вопросы безопасности и эффективности реализации фертильности мужчин с избыточной массой тела и ожирением. Накопленные научно-исследовательские данные позволяют утверждать, что в отсутствие лечебно-оздоровительных мероприятий или их неэффективности вероятность обращения подобной группы супружеских пар к репродуктологам и вступления в программы ЭКО возрастает втрое. Нами проведен детальный анализ влияния изменений углеводного и липидного обменов бесплодных мужчин на макро- и микроскопические характеристики эякулята. Изменения параметров эякулята мужчин с ИзбМТ и ожирением реализовалось преимущественно в снижении доли морфологически полноценных гамет, возрастании нарушений структурной целостности ДНК – вследствие влияния избыточного оксидативного стресса, отражаемого повышенным индексом фрагментации ДНК хроматина в головке сперматозоидов, наибольшие значения которого выявлены у мужчин с ожирением.

Эффективность молекулярно-биологических маркеров оценки «состоятельности» сперматогенеза мужчин с тяжелой формой патозооспермии заключается в возможности определения тактики ведения и использования спермы биологического отца и/или донора. Микрохирургическая техника (микро-ТЕСЕ) экстракции сперматозоидов с целью оплодотворения ооцитов в программе ЭКО-ИКСИ по результатам нашего исследования выступала не только безопасным и щадящим методом лечения, но и позволяла оценить уровень и степень тяжести нарушения сперматогенеза, в целом, демонстрируя лечебно-диагностический оптимум.

Итогом настоящего диссертационного исследования стала формулировка концепции ведения мужчин с эндокринопатиями и тяжелыми нарушениями сперматогенеза – от диагностического объема до

персонализированных подходов, позволяющих сделать выбор в пользу минимально травматичного и эффективного метода экстракции сперматозоидов из гонад.

Реализация репродуктивной функции мужчин с ИзбМТ и ожирением – проблема, требующая совместных усилий эндокринологов и репродуктологов. Полученные нами данные позволили подтвердить обоснованность заключений о неблагоприятном влиянии избыточного ИМТ на уровень Тест_{общ} и параметры спермы. Значительное количество доказательств делает менее обсуждаемой связь между ожирением и нарушением репродуктивных гормонов или наличием симптомов гипогонадизма. Полученные нами данные позволяют утверждать, что негативное влияние ожирения на репродуктивную ось мужчин реализуется на макро- и микроуровнях: диагностика ультраструктурных повреждений гамет оптимальна при введении в алгоритм обследования контингента ИФ ДНК и теста на связывание с гиалуронатом (НВА-тест).

Перспективы дальнейших исследований

Представляется, что расширение знаний о генезе азооспермии позволит повысить неэффективность исходов протоколов ЭКО-ИКСИ – за счет включения в рутинный объем диагностики специфических методов оценки ультраструктурной и функциональной состоятельности сперматогенеза (при котором образуются интактные зрелые сперматиды, при оплодотворении – нормальные зиготы с высоким потенциалом выхода бластоцист высокого качества). Комплексный подход к инфертильному мужчине, заинтересованному в генетическом потомстве, предполагает, помимо знания репродуктивной эндокринологии, аспектов уро-андрологии, клинической генетики и дифференцированного выбора современных вариантов вспомогательных репродуктивных технологий наряду с реалистичным обсуждением результатов лечения и альтернатив – усыновление или донорские гаметы.

Перспективы научно-исследовательского поиска для решения проблемы ведения мужчин с ИзбМТ и ожирением базируются на детализации регуляторных механизмов негативного влияния гормонов жировой ткани на репродуктивный потенциал, расширении возможностей диагностики причин ухудшения фертильности с уточнением всего спектра изменений эякулята, в том числе – на молекулярно-генетическом уровне, отрицательно влияющих на результаты ВРТ.

Полученные результаты позволили разработать следующие **алгоритмы обследования инфертильных мужчин с азооспермией** (Рисунок 7.1), **избыточной массой тела и ожирением** (Рисунок 7.2).

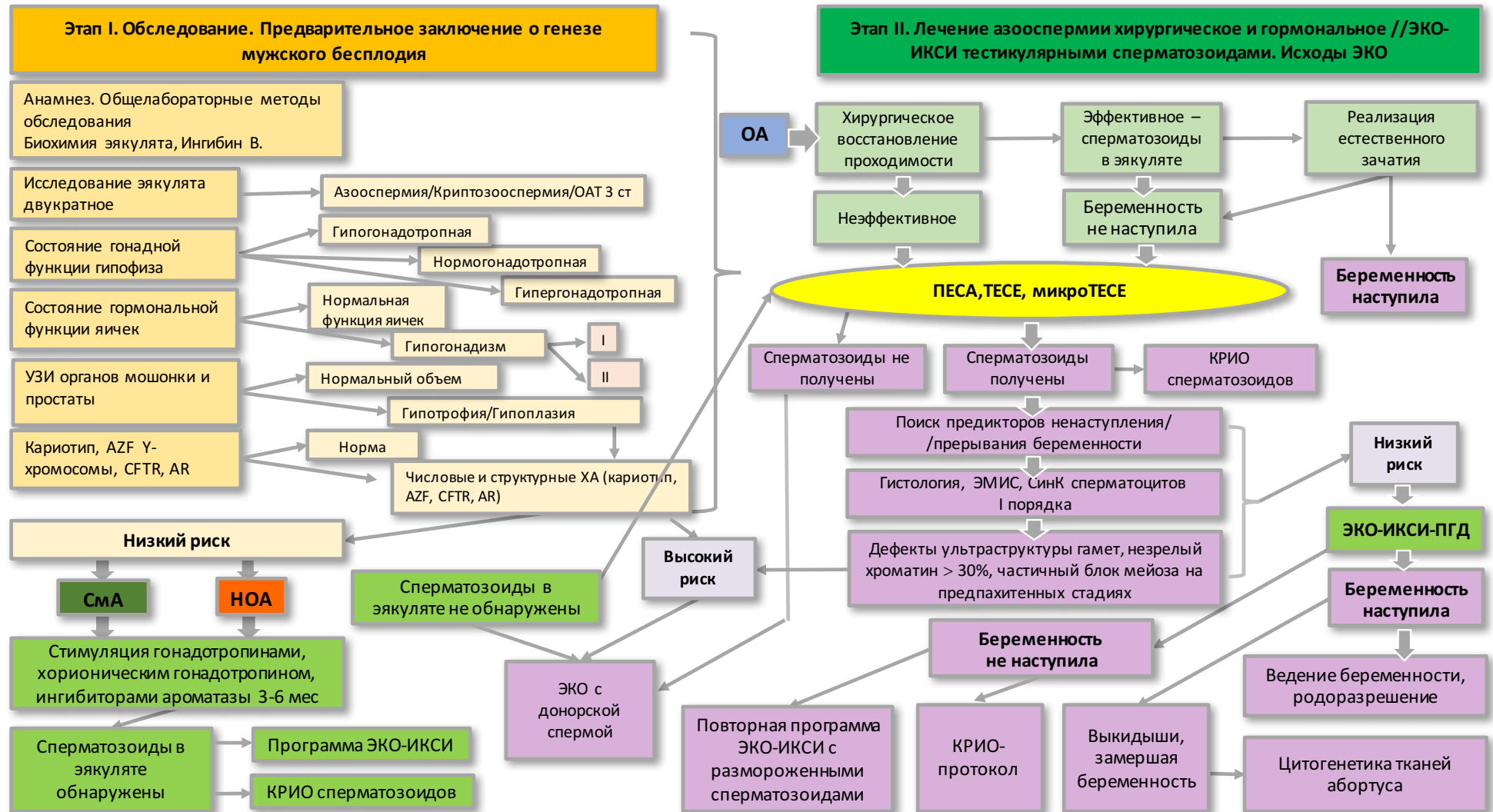
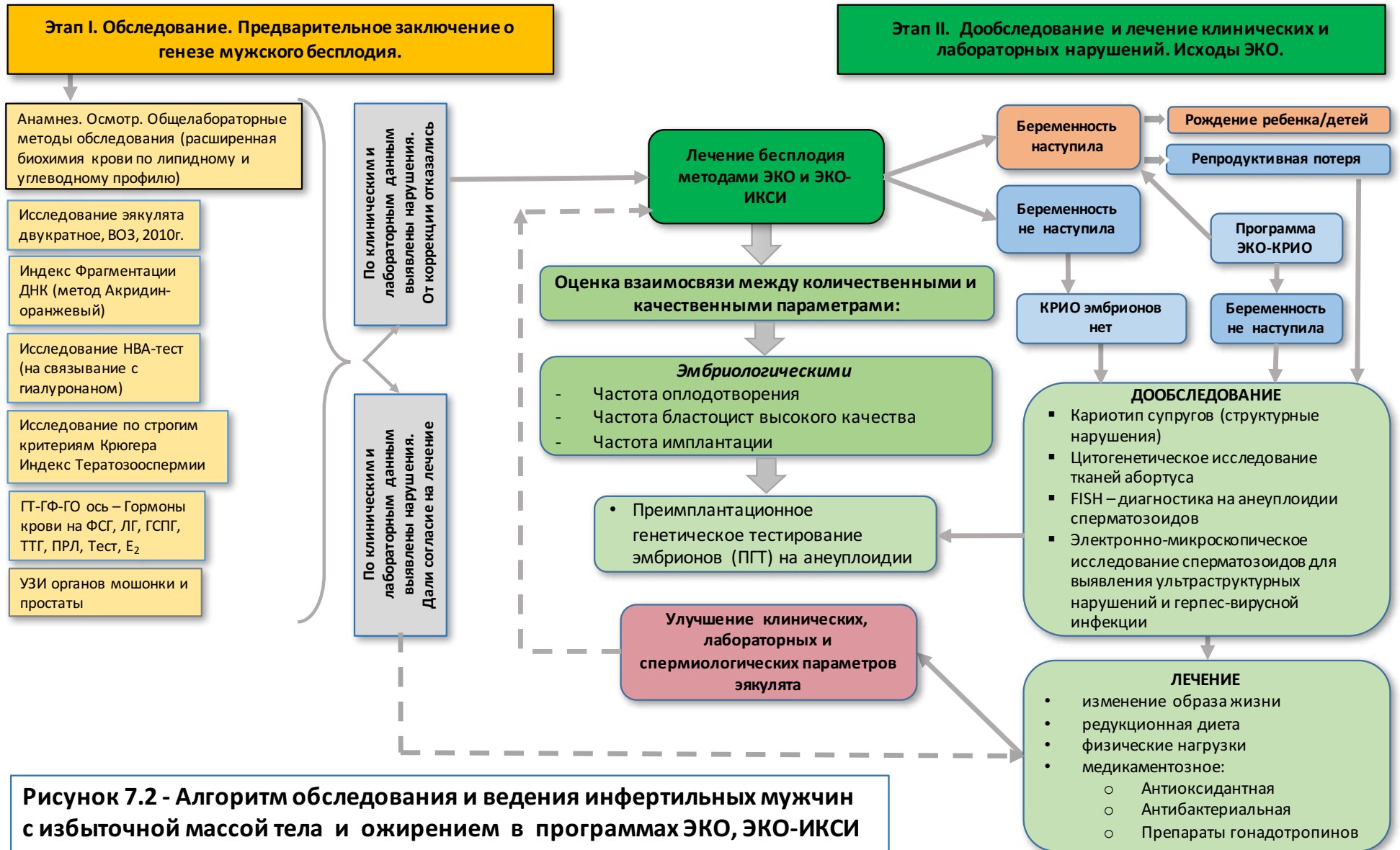


Рисунок 7.1 — Алгоритм обследования и ведения инфертильных мужчин с азооспермией



ВЫВОДЫ

Комплексное обследование семейных пар с преобладанием мужского фактора бесплодия (клинико-инструментальное, морфологическое), позволяющее уточнить генез нарушения сперматогенеза при азооспермии на ультраструктурном (геномном и постгеномном) уровне и индивидуализировать тактику ведения – с оценкой целесообразности извлечения тестикулярных сперматозоидов или использования донорской спермы в программах вспомогательных репродуктивных технологий, позволило сформировать выводы и практические рекомендации.

1. Нарушения сперматогенеза (олиго-, астено- тератозооспермия или их сочетание) обнаруживают у 62% мужчин. Мужской фактор бесплодия определяет обращаемость в программы ЭКО-ИКСИ в 28,8%, его сочетание с женскими факторами – в 56,8%. Частота азооспермии в структуре бесплодного брака составляет 7,3%: необструктивной формы – 40,4%, обструктивной – 29,2%, смешанной – 30,4%.

2. Особенности механизмов центральной регуляции сперматогенеза при необструктивной азооспермии являются нарушения функции гипофиза: гипергонадотропное состояние – 58,1%, гипогонадотропное – 7,6%, нормогонадотропное – 34,3%, со снижением объема гонад (в 59% – гипотрофия, 26,7% – гипоплазия яичек).

3. Частота выявления генетических нарушений при азооспермии составляет: хромосомные аномалии (ХА) – синдром Кляйнфельтера 47,XXY – 5,7%; мутантные генетические полиморфизмы – фактора азооспермии (AZF) региона Y-хромосомы (микроделеции) – 37,1%, генов муковисцидоза (*CFTR*) – 38,3% и андрогенового рецептора (*AR*, CAG-повторы) – 7,7%.

4. Эффективность извлечения тестикулярных сперматозоидов составляет: при ОА – 100%, НОА – 50,4%, смешанной азооспермии – 97%. Фенотипическая гетерогенность фрагментов семенных канальцев (при ОА в 27,4%, НОА – 77,3%, смешанной азооспермии – 61%) снижает возможность прогнозирования успешной экстракции сперматозоидов. Медикаментозная

стимуляция сперматогенеза до микро-ТЕСЕ повышает вероятность извлечения зрелых сперматид в три раза (63,2% против 24,2%) за счет возрастания соотношения $\text{Тест}_{\text{общ}}/\text{эстрадиол}$.

5. Ультраструктурными маркерами «дефектного» сперматогенеза (чаще при НОА) являются: высокое содержание структурно сохранных гамет с недостаточно конденсированным «незрелым» хроматином (более 30%), многослойная базальная мембрана при носительстве микроделеций AZFc региона Y-хромосомы.

Характер нарушений сперматогенеза на геномном уровне определяет тип повреждений синаптонемных комплексов сперматоцитов I порядка: блок на стадии пахитены профазы I мейоза (54,8%) и предпахитенных (зиготены-лептотены – по 15,2%), атипичная архитектура ядра (15,2% – при НОА), мейотическая катастрофа и фрагментация хромосом (в 40% при смешанной азооспермии и 25% – ОА).

6. Предиктором резкого угнетения сперматогенеза и неэффективности экстракции тестикулярных сперматозоидов (аплазия герминогенных клеток, Сертоли-клеточный синдром (СКС)) при НОА являются полные микроделеции AZFc (14,3%), частичные AZFb и сочетанные AZFb/c локусов Y хромосомы – у 28,6% (в 40% - с блоком мейоза на стадии зиготены), потенцирующие развитие первичного гипергонадотропного гипогонадизма в 66,7%.

7. Прогностически неблагоприятными факторами извлечения зрелых сперматид при немозаичной форме синдрома Кляйнфельтера являются длительная андрогензаместительная терапия, позитивными – молодой возраст (18,5 лет в среднем), уровень общего тестостерона более 250 нг/дл (8,7 нмоль/л). Результативность микро-ТЕСЕ при немозаичной форме синдрома Кляйнфельтера составляет 33,3%.

8. Доля мужчин с избыточной массой тела (ИзБМТ) и ожирением в бесплодных браках составляет 68,6%. Гормонально-метаболические нарушения негативно влияют на макро- и микроскопические параметры

сперматогенеза (ультраструктурные изменения): увеличение доли морфологически измененных форм сперматозоидов способствует снижению частоты оплодотворения, образования бластоцист высокого качества и наступления беременности – в полтора и 2,5 раза (37% и 21,7%). При ИФ ДНК>50% частота репродуктивных потерь возрастает в полтора раза (12,7% против 7,6%).

9. Гормонально-метаболические критерии эффективного извлечения сперматозоидов при азооспермии отсутствуют. Прогностическая значимость гистологических морфотипов при различной степени повреждения тканей гонад сомнительна ввиду сохранности микроочагов сперматогенеза. Эффективность экстракции тестикулярных сперматозоидов при остановке развития герминогенных клеток составляет 24,2%, Сертоли-клеточном синдроме – 6,1%.

10. Реализация репродуктивного потенциала мужчины (генетическое отцовство) при азооспермии достигается чаще в протоколах с переносом замороженных/размороженных эмбрионов: частота наступления беременности в группе НОА – 62,5%, обструктивной – 75%; смешанной форме – 16,7%. Наибольшая частота ранних репродуктивных потерь в «свежем» протоколе от мужчин с НОА (17,4% против 8,4% при других типах) определяется микроуровневыми повреждениями гамет (генетические и геномные, ультраструктурные, деструкции на уровне синаптонемных комплексов сперматоцитов I порядка).

11. Разработанные алгоритмы персонализированной тактики ведения способствуют преодолению бесплодия: у 50,6% пар с азооспермией, с обоснованием возможности использования спермы мужа (в 47,6%) после исключения тяжелых повреждений сперматогенеза специфическими методами исследования (геномные и постгеномные); с избытком массы тела мужчин – 58,7% пар (21,7% – ожирением), нормовесных – 57,7%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для определения тактики ведения мужчин с тяжелой степенью патозооспермии и прогнозирования вероятности экстракции сперматозоидов в программах ЭКО-ИКСИ-микро-ТЕСЕ традиционный комплекс исследований (сбор анамнеза, осмотр, сонография и доплерография органов мошонки и простаты, оценка гормонального профиля) целесообразно дополнять специфическими методами: молекулярно-цитогенетическое кариотипирование, исследование делеций генов *AZF* региона Y-хромосомы, мутаций и полиморфизмов генов муковисцидоза (*CFTR*) и *CAG*-полиморфизмов андрогенового рецептора (*AR*).

2. В категории мужчин с низкой вероятностью экстракции сперматозоидов (делеции локусов *AZF_a*, *AZF_b*, *AZF_{b,c}*, множественные *AZF_c* Y хромосомы, «возрастные» с синдромом Кляйнфельтера при длительном применении андрогензаместительной терапии, с поздним половым созреванием/крипторхизмом и гинекомастией) в протоколах ВРТ рекомендовано использовать донорскую сперму.

3. Преимущественный выбор в пользу микродиссекции ткани яичек показан при необструктивной форме азооспермии (в том числе повторные биопсии); неэффективных ранее открытых биопсиях и перкутанных (ТЕСЕ/ПЕСА) у мужчин с ОА - не ранее чем через 6 месяцев после первой хирургической манипуляции; у молодых мужчин с немозаичной формой синдрома Кляйнфельтера без применения андрогензаместительной терапии; пациентов с онкологическими заболеваниями (до операции и после химиотерапии).

4. При получении сперматозоидов от мужчин с синдромом Кляйнфельтера и образования после оплодотворения эмбрионов высокого качества, достигнувших стадии бластоцисты, необходима преимплантационная генетическая диагностика (полного геномного секвенирования (NGS)) для исключения анеуплоидий и выраженного мозаицизма. К переносу в полость

матки матери рекомендованы здоровые эмбрионы, не имеющие анеуплоидий, хромосомальный мозаицизм не более 20% (только после консультации генетика).

5. Для увеличения вероятности извлечения тестикулярных сперматозоидов целесообразна медикаментозная предоперационная подготовка, предусматривающая коррекцию андрогендефицитного состояния и стимуляцию остаточных очагов сперматогенеза у мужчин с НОА и смешанной азооспермией (по показаниям - препараты ингибиторов ароматазы, ХГч, менопаузальных и рекомбинантных гонадотропинов) в течение не менее 3-6 месяцев.

6. С целью прогнозирования эффективности программ ЭКО-ИКСИ (частота оплодотворения и наступления беременности), анализа причин ранних репродуктивных потерь при нормальном кариотипе тканей абортуса, выбора стратегии персонализированного лечения рекомендовано: после экстракции тестикулярных сперматозоидов мужа исследование состояния клеток сперматогенного эпителия семенных канальцев (ЭМИС) и иммуноцитогенетическое исследование синаптонемных комплексов (СинК) сперматоцитов I порядка.

7. При самопроизвольном прерывании или остановке развития беременности после ЭКО-ИКСИ-микро-ТЕСЕ рекомендовано цитогенетическое исследование тканей абортуса; ультразвуковой и биохимический скрининг на анеуплоидии в I триместре прогрессирующей беременности.

8. Избыточная масса тела или ожирение мужчин, состоящих в бесплодном браке, помимо стандартного комплекса обследования (спермограмма, MAR-тест, морфология по Крюгеру, оценка гормонально-метаболического статуса – углеводного и липидного обменов веществ, гонадотропной функции гипофиза и эндокринной функции яичек) предусматривает использование с целью повышения эффективности лечения в программах ЭКО/ЭКО-ИКСИ специальных исследований (ИФ ДНК

сперматозоидов, теста на связывание с гиалуроновой кислотой (НВА-тест) при концентрации сперматозоидов ≤ 41 млн/мл, морфологически нормальных форм $\leq 3\%$ и снижении прогрессивной подвижности $\leq 38\%$).

9. При ИФ ДНК сперматозоидов $>30\%$ целесообразна медикаментозная компенсация метаболических нарушений: редуцированная диета, антиоксидантная и антибактериальная терапия (устранение инфекций мочеполового тракта мужчины), в некоторых случаях – назначение гонадотропинов. Проведение программ ВРТ необходимо отсрочить до улучшения показателей индекса.

Список сокращений и условных обозначений

- АЗТ – андрогензаместительная терапия
 а-ГнРГ – агонисты гонадотропин релизинг гормонов
 АМГ – антимюллеров гормон
 анта-ГнРГ – антагонисты гонадотропин релизинг гормонов
 АТ-ТПО – антитела к тиреопероксидазе
 АО – акридин оранжевый
 БВК – бластоцисты высокого качества
 БМ – базальная мембрана
 Б/хБ – биохимическая беременность (преклинический спонтанный аборт/выкидыш)
 ВКМ – внутриклеточная масса
 ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
 ВПГ – вирус простого герпеса
 ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии
 ГТ-ГФ-ЯО (ГО)– гипоталаймо-гипофизарно-яичковая(гонадная) ось
 ГСПГ – глобулин, связывающий половые гормоны
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
 ДС – донорская сперма
 ЗХ – зрелый хроматин
 ИА – ингибиторы ароматазы
 ИзбМТ – избыточная масса тела
 ИКСИ – интрацитоплазматическая инъекция единичного сперматозоида в ооцит
 ИМТ – индекс массы тела
 ИППП – инфекции, передаваемые половым путем
 ИРИ – иммунореактивный инсулин
 ИТ – индекс тератозооспермии
 ИФ ДНК – индекс фрагментации ДНК
 ЛГ – лютеинизирующий гормон
 ЛПВП – липопротеиды высокой плотности
 ЛПНП - липопротеиды низкой плотности
 МБ – мужское бесплодие
 МЕСА/MESA – Микрохирургическая аспирация эпидидимальных сперматозоидов/Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration).
 микро-ТЕСЕ – микрохирургическое извлечение тестикулярных сперматозоидов
 МЦ – менструальный цикл
 МI – метафаза I
 МII – метафаза II
 НБ – неразвивающаяся беременность
 НГЭ – наружный генитальный эндометриоз
 НОА – необструктивная азооспермия
 НХ – незрелый хроматин
 ОА – обструктивная азооспермия

ОКК – ооцит-кумулюсный комплекс
 ОС – остановка сперматогенеза
 ПЕСА/PESA – перкутанная аспирация эпидидимальных сперматозоидов/
 Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration
 ПГД – преимплантационная генетическая диагностика
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 ПРЛ – пролактин
 р-ФСГ – рекомбинантный ФСГ
 р-ХГ – рекомбинантный ХГ
 свТ4 – тироксин свободный
 свТ3 – трийодтиронин свободный
 СД – сахарный диабет
 СинК – синаптонемный комплекс
 СК – синдром Кляйнфельтера
 ККС – Сертоли клеточный синдром
 СМ – сперматозоиды мужа
 СПКЯ – синдром поликистозных яичников
 ТБ – трубная беременность
 Т_{общ} - тестостерон общий
 Т_{св} – тестостерон свободный
 Т_{био} – тестостерон биодоступный
 ТЕСЕ/ТЕСЕ – Тестикулярная экстракция сперматозоидов/
 Testicular Sperm Extraction)
 ТГ – триглицериды
 ТРУЗИ – трансректальное ультразвуковое исследование
 ТТГ – тиреотропный гормон
 ФСГ – фолликулостимулирующий гормон
 ХА – хромосомные аномалии
 ХГЧ – Хорионический гонадотропин человека
 ХС – холестерин
 ЦМВ – цитомегаловирус
 ЧИ/IR – частота имплантации/implantation rate, IR
 ЧИС/SRR; – частота извлечения сперматозоидов/Sperm Retrieval Rate
 ЧНБ/PR – частота наступления беременности/pregnancy rate
 ЧО/ FR – частота оплодотворения/fertility rate
 ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение
 ЭМИС – электронно-микроскопическое исследование сперматозоидов
 2PN – нормально оплодотворенные ооциты
 AR – андрогеновый рецептор
 AZF – Azoospermia Factor, фактор азооспермии
 CFTR – Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
 (регулятор трансмембранной проводимости при муковисцидозе)
 DAZ – Deleted in Azoospermia, гены, делетированные при азооспермии
 E₂ – эстрадиол
 FISH – флуоресцентная гибридизация in situ
 GCA – Germ cell arrest (Остановка развития зародышевых клеток)

GV – герминальный везикул

HS – Hypospermatogenesis (Гипосперматоге́нез)

HBA-тест – тест на связывание с гиалуроновой кислотой, Sperm-Hyaluronan

HSP – Heat Shock Protein A2, белок теплового шока

MLH1 – ген MutL гомолог 1

STH – Seminiferous tubule hyalinization (Гиалинизация семенных канальцев)

SCP- single-cell protein трансверсальные филаменты

SCO – Sertoli cell only (Сертоли-клеточный синдром, СКС)

SPAM1 – Sperm adhesion molecule 1

t – температура

TFNA – Testicular fine needle aspiration,

тестикулярная тонкоигольная биопсия

TUNEL – Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated Nick end labeling

ZP – Zona pellucida, Зона пеллюцида, блестящая оболочка

ЛИТЕРАТУРА

1. Андрологические аспекты бездетного брака / В.А. Божедомов, И.М. Рохликов, А.А. Третьяков [и соавт.] // Медицинский совет. – 2013. – № 8. – Т.1. – С. 13–17.
2. Баранов В.С. Цитогенетика эмбрионального развития человека: Научно–практические аспекты / В.С. Баранов, Т.В. Кузнецова // СПб.: Издательство Н–Л; 2007. – 640 с.
3. Богданов Ю.Ф. Синаптонемный комплекс – индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом / Ю.Ф. Богданов, О.Л. Коломиец // КМК Scientific Press Ltd. М. – 2007. – 358 С.
4. Божедомов В.А. Мужское бесплодие. В кн.: Андрология. Клинические рекомендации. Под ред. П.А. Щеплева. М.: Медпрактика – 2012. – С. 30–58.
5. Бочарова Е.Н. Количественное ультраструктурное исследование сперматозоидов человека при нарушениях фертильности / Е.Н. Бочарова, Е.Е. Брагина, Ю.К. Гусак // Вестн нов мед технол. – 2007. – № 24 (4) . – С. 199–201.
6. Брагина Е.Е. Количественное электронно–микроскопическое исследование сперматозоидов при диагностике мужского бесплодия / Е.Е. Брагина, Е.Н. Бочарова // Андрология и генитальная хирургия. – 2014. – №1. – С. 41–50.
7. Варианты ультраструктурной патологии сперматозоидов при мужском бесплодии / С.В. Пичугова, Л.Г. Тулакина, А.В. Клейн [и соавт.] // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2012. – № 1 (38). – С. 72–75.
8. Влияние бессимптомной формы герпес–вирусной инфекции на эффективность лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий. / А.Г. Абдулмеджидова, И.Г. Торганова, И.И. Витязева [и соавт.] // Акушерство и гинекология. – 2009. – №1. – С. 45–8.
9. Влияние САG–полиморфизма гена андрогенового рецептора (*AR*) на сперматогенез у мужчин с бесплодием / В.Б. Черных, С.А. Руднева, Т.М. Сорокина [и соавт.] // Андрология и генитальная хирургия. – 2015. – Т.16.– С. 55–61.

10. Восстановление фертильности мужчины с азооспермией, развившейся при применении тестостерона в форме геля (клиническое наблюдение) / И.А. Корнеев, Р.Д. Зассеев, О.И. Забелкина // Андрология и генитальная хирургия. – 2017. – Т. 18. – № 3. – С. 64-67.
11. Гришаева Т.М. Анализ *in silico* структурной основы функциональных различий соматических и мейотических форм когезинов SCC3/SA/STAG / Т.М. Гришаева, С.Я. Дадашев, Ю.Ф. Богданов // Вестник ВОГиС. – 2010. – Т.14. – №1. – С. 96 –105.
12. Дедов И.И. «Эндокринология. Национальное руководство» / И.И. Дедов, Г.А. Мельниченко // М.: ГЭОТАР–Медиа. – 2009. – 475 с.
13. Джонс К. Наследственные синдромы по Дэвиду Смиту: атлас–справочник. Пер. с англ. А.Г. Азова, И.А. Ивановой, А.В. Мишарина [и соавт.] / Джонс К. // М: Изд–во Практика. – 2011. – С. 70–72.
14. Интегральный показатель – новый способ оценки фертильности мужчин / С.Б. Артифексов, М.Ю. Сергеев [и соавт.] // Современные технологии в медицине. – 2011. – № 3. – С.106–109.
15. К диагностике нарушений репродуктивной функции мужчин / М.Н. Тарасова, Г.Н. Чистякова, И.И. Ремизова [и соавт.] // Проблемы репродукции. – 2008. – № 5. – С.52–55.
16. Калинин С. Ю. Клиническая андрология / С.Ю. Калинин, И.А. Тюзиков. // М.: Практическая медицина. – 2009. – 399 с.
17. Калинин С.Ю. Клинические «маски» синдрома Клайнфельдтера / Калинин С.Ю., Виноградов И.В. // Андрология и генитальная хирургия. – 2011. – №2. – С. 86–89.
18. Количественное ультраструктурное исследование хроматина сперматозоидов при нарушении фертильности / Е.Е. Брагина, В.А. Замятина, Е.Н. Бочарова [и соавт.] // Андрология и генитальная хирургия. – 2009. – №1. – С. 44–9.
19. Компактизация ДНК в сперматозоидах человека. I. Динамика изменений компактизации нуклеогистонного и нуклеопротаминного хроматина в

- дифференцирующихся сперматидях / Е.А. Арифалин, Е.Е. Брагина, В.А. Замятнина [и соавт.] // Онтогенез. – 2012. – № 2. – С.143–53.
20. Курило Л.Ф. Типы хромосомных аномалий у пациентов с нарушением формирования и/или функции органов репродуктивной системы / Л.Ф. Курило, С.И. Гордеева // Андрология и генитальная хирургия. – 2009. – № 3. – С. 24–28.
21. Морфологическое проявление в профазе I мейоза человека уникального сегмента ДНК / Ю.Ф. Богданов, В.Е. Спангенберг, С.Я. Дадашев [и соавт.] // Цитология. – 2012. – Т.54. – №8. – С. 603 – 607.
22. Назаренко Т. А. Эндокринные факторы женского и мужского бесплодия: принципы гормонального лечения / Т. А. Назаренко. – Москва: Медицинское информационное агентство, 2017. – 132 с.
23. Нарушение конденсации хроматина сперматозоидов и фрагментация ДНК сперматозоидов: есть ли корреляция? / Е.Е. Брагина, Е.А. Арифалин, Е.М. Лазарева [и соавт.] // Андрология и генитальная хирургия. – 2017. – Т.1. – №18. – С. 48–61.
24. Нарушения структуры синаптонемных комплексов и особенности селекции сперматоцитов I порядка у мыши в ответ на введение лекарственных препаратов / О.Л. Коломиец, М.М. Ацаева, С.Я. Дадашев [и соавт.] // Генетика. – 2013. – Т. 49. – № 9. – С. 1261–1269.
25. Оптимизация оценки метаболического статуса у мужчин с ожирением и различным уровнем эндогенного тестостерона / Н.С. Худякова, О.А. Африкьян, И.А. Хрипун, С.В. Воробьев // В книге «Завадские чтения». Материалы XIII межрегиональной научно-практической конференции молодых учёных с международным участием по актуальным вопросам внутренней патологии. – 2018. – С. 162-164.
26. Роль структурных нарушений хроматина и ДНК сперматозоидов в развитии бесплодия / В.А. Божедомов, Н.А. Липатова, Е.А. Спориш [и соавт.] // Андрология и генитальная хирургия. – 2012. – №3. – С. 83–91.
27. Руководство ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека. 5–е изд. М. – 2012. – 291 с.

28. Сухих Г.Т., Мужское бесплодие: Новейшее руководство для урологов и гинекологов / Г.Т. Сухих, В.А. Божедомов // М.: Эксмо. – 2009. – 240 с.
29. Упаковка хроматина и фрагментация ДНК – два типа нарушений наследственного материала сперматозоидов / Е.Е. Брагина, В.А. Замятина, Ю.А. Гаврилов [и соавт.] // Мед. ген. – 2009. – №8. – Т. – № 10. – С. 29–35.
30. Федорова И.Д. Генетические факторы мужского бесплодия / И.Д. Федорова, Т.В. Кузнецова // Журнал акушерства и женских болезней. – № 1. – 2007. – С. 64–72.
31. Фрагментация мДНК в сперматозоидах и ее взаимосвязь с нарушением сперматогенеза / С.А. Руднева, Е.Е. Брагина, Е.А. Арифудин [и соавт.] // Андрология и генитальная хирургия. – 2014. – № 4. – С. 26–33.
32. Черных В.Б. AZF делеции – частая генетическая причина бесплодия у мужчин: современное состояние исследований / В.Б. Черных // Проблемы репродукции. – 2009. – № 1. – С. 10–15.
33. Черных В.Б. Ген муковисцидоза и нарушение фертильности у мужчин / В.Б. Черных // Андрология и генитальная хирургия. – 2010. – № 4. – С. 23–31.
34. Черных В.Б. Микроделеции Y-хромосомы и мутации гена CFTR как причина бесплодия у мужчин: Сб. Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Новосибирск: Альфа-Виста Н. – 2008. – № 12. – С. 119–126.
35. Чиркова Е.Ю. Использование метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) для обнаружения генетических изменений у мужчин с нарушением сперматогенеза / Е.Ю. Чиркова, Д.Д. Иванова, С.С. Литвинов // Андрология и генитальная хирургия. – 2011. – № 2. – С.125–126.
36. A decade of experience emphasizes that testing for Y microdeletions is essential in American men with azoospermia and severe oligozoospermia / P.J. Stahl, P. Masson, A. Mielnik [et al.] // Fertil Steril. – 2010. – N.94. – P. 1753–6.
37. A decade of sperm washing: clinical correlates of successful insemination outcome / J.D. Nicopoulos, P. Almeida, M. Vourliotis [et al.] // Hum Reprod. – 2010. – N.25. – P.1869–1876.

38. A double-blinded comparison of in situ TUNEL and aniline blue versus flow cytometry acridine orange for the determination of sperm DNA fragmentation and nucleus decondensation state index / J. Hamidi, C. Frainais, E. Amar [et al.] // *Zygote*. – 2015. – N.23(4). – P.556–62.
39. A frequent Y chromosome b2/b3 subdeletion shows strong association with male infertility in Han – Chinese population / B. Wu, N.X. Lu, Y.K. Xia [et al.] // *Hum Reprod*. – 2007. – N.22. – 4. –P.1107–1113.
40. A genetic survey of 1935 Turkish men with severe male factor infertility / Kumtepe Y., Beyazyurek C., Cinar C. [et al.]. // *Reprod Biomed Online*. – 2009. – N.18(4). – P.465–74.
41. A human morphologically normal spermatozoon may have noncondensed chromatin / F. Boitrelle, M. Pagnier, Y. Athiel [et al.]. // *Andrologia*. – 2015. – N.47(8). – P.879–86.
42. A systematic review and metaanalysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome / L. Simon, A. Zini, A. Dyachenko [et al.] // *Asian J Androl*. – 2017. – N.19(1). – P.80–90.
43. Abdel Razic MM. Nonmosaic 47, XYY syndrome presenting with male infertility: case series / M.M. Abdel Razic, L.A. Abdel Hamid, E.S. Elsobky // *Andrologia*. – 2012. – N.44. – P. 200–4.
44. Abu D. A. Sequential analysis of sperm unctinal aspects involved in fertilisation: a pilot study / D.A. Abu, D.R. Franken, B. Hoffman // *Andrologia*. – 2012. – N.44(Suppl 1). – P. 175–81.
45. Adamopoulos D.A. Value of FSH and inhibin-B measurements in the diagnosis of azoospermia – a clinician's overview / Adamopoulos D.A., Koukkou E.G. // *Int J Androl*. – 2010 – N.33. – P. 109–113.
46. Adequate ovarian follicular status does not prevent the decrease in pregnancy rates associated with high sperm DNA fragmentation / Frydman N., N. Prisant, L. Hesters [et al.] // *Fertil Steril*. – 2008. – N.89. – P. 92–7.

47. Adult onset of declining spermatogenesis in a man with nonmosaic Klinefelter's syndrome / K. Ichioka, N. Utsunomiya, N. Kohei [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2006. – N.85. – P.1511–1512.
48. Advancing paternal age and risk of autism: new evidence from a population-based study and a meta-analysis of epidemiological studies / C.M. Hultman, S. Sandin, S.Z. Levine [et al.] // *Mol Psychiatry*. – 2010. – N.16(12). –P.1203–1212.
49. Age and markers of Leydig cell function, but not of Sertoli cell function predict the success of sperm retrieval in adolescents and adults with Klinefelter's syndrome / J. Rohayem, R. Fricke, K. Czeloth [et al.] // *Andrology*. – 2015. – N.3. – P.868–75.
50. Age as a limiting factor for successful sperm retrieval in patients with nonmosaic Klinefelter's syndrome / H. Okada, K. Goda, Y. Yamamoto [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2005. – N.84. – P.1662–1664.
51. Age as only predictive factor for successful sperm recovery in patients with Klinefelter's syndrome / K. Ferhi, R. Avakian, J.F. Griveau [et al.] // *Andrologia*. – 2009. – V. 41. – N.2. – P. 84–87.
52. Aging may adversely affect testicular sperm recovery in patients with Klinefelter syndrome / M. Emre Bakircioglu, H.F. Erden, T. Kaplancan [et al.] // *Urology*. – 2006. –V.68. – P. 1082–6.
53. Aksglaede L. Testicular function and fertility in men with Klinefelter syndrome: a review / L. Aksglaede, A. Juul // *Eur J Endocrinol*. – 2013. – N.68(4). –P. R67–76.
54. Alukal J.P. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)–what are the risks / J.P. Alukal, D.J. Lamb // *Urol Clin North Am*. – 2008. – V. 35. – N.2. – P. 277–88.
55. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics ACOG Committee Opinion No. 486: Update on carrier screening for cystic fibrosis / *Obstet Gynecol*. – 2011. – N.117. – P. 1028–31.
56. Ammar T. Male infertility: the role of imaging in diagnosis and management / T. Ammar, P.S. Sidhu, C.J. Wilkins // *Br J. Radiol*. – 2012. – N.85 Spec No 1. – P. 59–68.

57. An aromatase polymorphism modulates the relationship between weight and estradiol levels in obese men / A. Hammoud, D.T. Carrell, A.W. Meikle [et al.] // *Fertil Steril.* – 2010. – N.94. – P.1734–8.
58. Androgen decline in patients with nonobstructive azoospermia after microdissection testicular sperm extraction / S. Takada, A. Tsujimura, T. Ueda [et al.] // *Urology.* – 2008. – N.72. – P.114–8.
59. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*, 3rd ed. E. Nieschlag, H.M. Behre, S. Nieschlag (eds.). Springer. – 2010. – 629 p.
60. Aponte P.M. Biotechnological approaches to the treatment of aspermatogenic men / P.M. Aponte, S. Schlatt, L.R. Franca // *Clinics (Sao Paulo).* – 2013. – V. 68. –N.1. – P. 157–67.
61. Application of percutaneous epididymal sperm aspiration in azoospermia/ L. Hao, Z.G. Li, H.G. He [et al.] / *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2017. – N.21. – P.1032–5.
62. Are adolescent boys with Klinefelter syndrome androgen deficient? A longitudinal study of Finnish 47, XXY boys / A.M. Wikstrom, L. Dunkel, S. Wickman [et al.] / *Pediatric Research.* – 2006. – N.59. – P.854–859.
63. Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles / A. Perdrix, A. Travers, M.H. Chelli [et al.] // *Hum Reprod.* – 2011. – N.26. – P.47–58.
64. Assessment of azoospermia and histological evaluation of spermatogenesis / G. Robin, F. Boitrelle, X. Leroy [et al.] // *Ann Pathol.* – 2010. – N.30(3). – P.182–95.
65. Assisted reproductive technology may increase clinical mutation detection in male offspring / C. Feng, L.Q. Wang, M.Y. Dong [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2008. – N.90(1). – P.92–6.
66. Association between obesity and alteration of sperm DNA integrity and mitochondrial activity / R.M. Fariello, J.R. Pariz, D.M. Spaine [et al.] // *BJU Int.* – 2012. – N.110(6). – P.863–867.
67. Association of body mass index with some fertility markers among male partners of infertile couples / M. Hajshafiha, R. Ghareaghaji, S. Salemi [et al.]// *Int J Gen Med.* – 2013. – N.6. – P.447–51.

68. Association of spermatogenic failure with the b2/b3 partial AZFc deletion / A. Eloualid, H. Rhaissi, A. Reguig [et al.] // PLoS One. – 2012. – N.7(4).
69. Associations of Y–chromosome subdeletion gr/gr with the prevalence of Y–chromosome haplogroups in infertile patients. Eur. J. / M. Shahid, V.S. Dhillon, H.S. Khalil [et al.] // Hum. Genet. – 2011. – N.19(1). – P. 23–9.
70. Aston K.I. Genetic susceptibility to male infertility: news from genome-wide association studies / K.I. Aston // Andrology. – 2014. – N.2(3). – P.315–21.
71. Athalye A.S. [et al.] A study of Y chromosome microdeletions in infertile Indian males. / A.S. Athalye [et al.] // Int J Hum Genet. – 2004. – N. 4. – P.179–85.
72. Attitudes of Klinefelter men and their relatives towards TESE–ICSI / M.C. Maiburg, A.C. Hoppenbrouwers, van H.F. Stel [et al.] // J Assist Reprod Genet. – 2011. – N.28(9). – P.809–14.
73. AZF gene microdeletions: case series and literature review / A. Gallego, R. Rogel, S. Luján [et al.] // Actas Urol Esp. – 2014. – V. 38. –N. 10. – P. 698–702.
74. AZF microdeletions of the Y chromosome and in vitro fertilization outcome / J. Choi, P. Chung, L. Veeck [et al.] // Fertil Steril. – 2004. – N. 81. – P. 337–41.
75. AZF microdeletions on the Y chromosome in infertile Chinese men: a five–year retrospective analysis / Y.C. Shi, Y.X. Cui, L. Wei [et al.] // Zhonghua Nan Ke Xue. –2010. – N.16. – P.9.
76. AZFa Microdeletions: Occurrence in Chinese Infertile Men and Novel Deletions Revealed by Semiconductor Sequencing / X.Y. Liu, H.Y. Zhang, D.X. Pang [et al.] //Urology. – 2017. – N.107. – P.76–81.
77. AZFc deletions and spermatogenic failure: a population–based survey of 20,000 Y chromosomes / S.G. Rozen, J.D. Marszalek, K. Irenze [et al.] // Am J Hum Genet 2012. – N.91(5). – P.890–6.
78. AZFc deletions do not affect the function of human spermatogonia *in vitro* / B. Nickkholgh, C.M. Korver, S.K.M. van Daalen [et al.] // Mol Hum Reprod. – 2015. – N.21(7). – P.553–562.

79. AZFc partial deletions in Chilean men with severe spermatogenic failure / M.C. Lardone, A. Parodi, M. Ebensperger [et al.] // *Fertil Steril.* – 2007. – N.88(5). – P.1318–26.
80. Aziz N. The importance of semen analysis in the context of azoospermia. / N. Aziz // *Clinics (Sao Paulo).* – 2013. – V. 68. – N.1– P. 35–8.
81. Azoospermia and a history of inguinal hernia repair in adult / M. Khodari, A. Ouzzane, F. Marcelli [et al.] // *Prog Urol.* – 2015. – N.25(12). – P.692–7.
82. Azoospermia factor microdeletions: occurrence in infertile men with azoospermia and severe oligozoospermia from China / Y.S. Zhang, R.L. Dai, R.X. Wang [et al.]// *Andrologia.* – 2014. – N.46. – P.535 – 540.
83. Azoospermia: virtual reality or possible to quantify? / T.G. Cooper, B. Hellenkemper, J. Jonckheere [et al.] // *J Androl.* – 2006. – N.27. – P.483–490.
84. Bar G. Klinefelter syndrome: genetic aspects, characteristics and reproduction—present and future / G. Bar, L E. unefeld, E. Levitas // *Harefuah.* – 2014. – N.153(6). –P.342–5, 366.
85. Basar M.M. Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios / M.M. Basar, S. Kahraman // *Transl Androl Urol.* – 2017. – N.6(Suppl 4). – P.574–576.
86. Beliveau M.E. The value of testicular «mapping» in men with non-obstructive azoospermia / M.E. Beliveau, P.J. Turek // *Asian J Androl.* – 2011. – N.13(2). – P.225–230.
87. Bernie A.M. Predictive factors of successful microdissection testicular sperm extraction / A.M. Bernie, R. Ramasamy, P.N. Schlegel // *Basic Clin Androl.* – 2013. – N. 23. – P. 5.
88. Berookhim B.M. Azoospermia due to spermatogenic failure. / B.M. Berookhim, P.N. Schlegel // *Urol Clin North Am.* – 2014. – N.41. – P.97–113.
89. Bieniek J.M. Seminal biomarkers for the evaluation of male infertility / J.M. Bieniek, A.P. Drabovich, K.C. Lo // *Asian J Androl.* – 2016. – V. 18. – N. 3. – P. 426–33.

90. Birth of 16 healthy children after ICSI in cases of nonmosaic Klinefelter syndrome / E. Greco, F. Scarselli, M.G. Minasi [et al.] // *Hum Reprod.* – 2013. – N.28(5). – P.1155–60.
91. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis / N. Sermondade, C. Faure, L. Fezeu [et al.] // *Hum Reprod Update.* – 2013. – N.19(3). – P.221–31.
92. Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic / J.E. Chavarro, T.L. Toth, D.L. Wright [et al.] // *Fertil Steril.* – 2010. – N.93. – P. 2222–31.
93. Body Mass Index Is Associated with Impaired Semen Characteristics and Reduced Levels of Anti-Müllerian Hormone across a Wide Weight Range / J.M. Andersen, H. Herning, E.L. Aschim [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – V.10. – N.6. – P. 0130210.
94. Bunyan D.J. Detection of partial deletions of Y chromosome AZFc in infertile men using the multiplex ligation-dependent probe amplification assay / D.J. Bunyan, J.L. Callaway, N. Laddach // *J Reprod Infertil.* – 2012. – N.13. – P.174–178.
95. Cai Z.M. Y chromosome microdeletion and male infertility: past, present and future / Z.M. Cai // *Zhonghua Nan Ke Xue.* – 2010. – N.16(5). – P. 94.
96. Campagne D.M. Can Male Fertility Be Improved Prior to Assisted Reproduction through The Control of Uncommonly Considered Factors? / D.M. Campagne // *Int J Fertil Steril.* – 2013. – N.6(4). – P.214–23.
97. Can Hyaluronan Binding Assay Predict the Outcome of Intrauterine Insemination in Couples with Unexplained or Mild Male Factor Infertility? / M. Yildirim, C.I. Duvan, A. Pekel [et al.] // *J. Reprod Infertil.* – 2015. – N.16(1). – P.18–23.
98. 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, M. Kirac, S. Gurocak [et al.] // *Int Urol Nephrol.* – 2006. – N.38(3–4). – P.629–35.

99. Carpi A. Controversies in the management of nonobstructive azoospermia / A. Carpi, E. Sabanegh, J. Mechanick // *Fertil Steril.* – 2009. – N. 91. – P. 963–70.
100. Carrell D.T. Epigenetics of the male gamete / D.T. Carrell // *Fertil. Steril.* – 2012. – T.97. – N.2. – P. 267–74.
101. Carrell D.T. The aetiology of sperm protamine abnormalities and their potential impact on the sperm epigenome / D.T. Carrell, B.R. Emery, S. Hammoud // *Int. J. Androl.* – 2008. – T. 31. – N.6. – P. 537–45.
102. Carrell D.T. The clinical implementation of sperm chromosome aneuploidy testing: pitfalls and promises / D.T. Carrell // *J Androl.* – 2008. – N.29(2). – P.124–33.
103. Castillo J. Sperm nuclear proteome and its epigenetic potential / J. Castillo, A. Amaral, R. Oliva // *Andrology.* – 2014. – N.2(3). – P. 326–38.
104. Ceylan G.G. Genetic anomalies in patients with severe oligozoospermia and azoospermia in eastern Turkey: a prospective study / G.G. Ceylan, C. Ceylan, H. Elyas // *Genet Mol Res.* – 2009. – V. 8. – N.3. – P. 915–22.
105. CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): a systemic review and meta-analysis / J. Yu, Z. Chen, Y. Ni [et al.] // *Hum Reprod.* – 2012. – N.27. – P.25–35.
106. Chromosomal abnormalities in 1663 infertile men with azoospermia: the clinical consequences / R.B. Donker, V. Vloeberghs, H. Groen [et al.] // *Hum Reprod.* – 2017. – N.13. – P.1–7.
107. Chromosomal anomalies and Y-microdeletions among Chinese subfertile men in Hong Kong / P.P. Ng, M.H. Tang, E.T. Lau [et al.] // *Hong Kong Med J.* – 2009. – N.15(1). – P.31–8.
108. Chromosomal abnormalities in azoospermic and non-azoospermic infertile men: numbers needed to be screened to prevent adverse pregnancy outcomes / E.C. Dul, J. Van Echten-Arends, H. Groen [et al.] // *Human Reproduction.* – 2012. – V. 27. – P. 2850–2856.
109. Chromosomal abnormalities in embryos derived from testicular sperm extraction / S. Silber, T. Escudero, K. Lenahan [et al.] // *Fertil Steril.* – 2003. – N.79(1). – P.30–8.

110. Chromosomal abnormalities in men with pregestational and gestational infertility in northeast China / D. Li, H. Zhang, R.J. Wang [et al.] // *Assist. Reprod. Genet.* – 2012. – N.29(8). – P.829–36.
111. Chromosomal abnormalities in patients with oligozoospermia and non-obstructive azoospermia / L.Y. Pylyp, L.O. Spinenko, N.V. Verhoglyad [et al.] // *J Assist Reprod Genet.* – 2013. – N.30. – P.729–32.
112. Clinical and biological parameters in 166 boys, adolescents and adults with nonmosaic Klinefelter syndrome: a Copenhagen experience / L. Aksglaede, N.E. Skakkebaek, K. Almstrup [et al.] // *Acta Paediatrica.* – 2011. – N.100. – P. 793–806.
113. Clinical comparison of conventional testicular sperm extraction and microdissection techniques for non-obstructive azoospermia / I.F. Ghalayini, M.A. Al-Ghazo, O.B. Hani [et al.] // *J Clin Med Res.* – 2011. – N.3(3). – P.124–31.
114. Clinical comparison of successful and failed microdissection TESE in patients with non-mosaic Klinefelter syndrome / M. Koga, A. Tsujimura, M. Takeyama [et al.] // *Urology.* – 2007. – N.70. – P.341–5.
115. Clinical data and parenthood of 63 infertile and Y-microdeleted men / C. Patrat, T. Bienvenu, L. Janny [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2010. – N.93(3). – P.822–32.
116. Clinical diagnostic testing for the cytogenetic and molecular causes of male infertility: the Mayo Clinic experience / S. Hofherr, A. Wiktor, B. Kipp [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* – 2011. – N.8. – P.1091–1098.
117. Clinical factors associated with sperm DNA fragmentation in male patients with infertility / A. Komiya, T. Kato, Y. Kawauchi [et al.] // *ScientificWorldJournal.* – 2014.
118. Clinical outcomes and development of children born to couples with obstructive and nonobstructive azoospermia undergoing testicular sperm extraction–intracytoplasmic sperm injection: A comparative study / Y.R. Tsai, F.J. Huang, P.Y. Lin [et al.] // *Taiwan J Obstet Gynecol.* – 2015. – N.54(2). – P.155–9.
119. Clinical review: Klinefelter syndrome – A clinical update / K.A. Groth, A. Skakkebaek, C. Host [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2013. – N.98. – P.20–30.

120. Clinical significance of reactive oxygen species in semen of infertile Indian men / S. Venkatesh, A.M. Riyaz, M.B. Shamsi [et al.] // *Andrologia*. – 2009. – 41. – P.251–56.
121. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome / L. Simon, G. Brunborg, M. Stevenson [et al.] // *Hum Reprod*. – 2010. – N.25. – P.1594–1608.
122. Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios / A. Agarwal, A. Majzoub, S.C. Esteves [et al.] // *Transl Androl Urol*. – 2016. – N.5(6). – P.935–50.
123. Cocuzza M. The epidemiology and etiology of azoospermia / M. Cocuzza, C. Alvarenga, R. Pagani // *Clinics (Sao Paulo)*. – 2013. – V.68. – N.1. – P. 15–26.
124. Collins J.A. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? / J.A. Collins, K.T. Barnhart, P.N. Schlegel // *Fertil Steril*. – 2008. – N.89. – P.823–31.
125. Combination of serum inhibin B and follicle–stimulating hormone levels can not improve the diagnostic accuracy on testicular sperm extraction outcomes in Chinese non–obstructive azoospermic men / X. Huang, Q. Bai, L.Y. Yan [et al.] // *Chin Med J (Engl)*. – 2012. – N.125(16). – P.2885–9.
126. Combined evaluation of serum follicle–stimulating hormone, inhibin B, chromosome karyotyping and AZF microdeletion of Y–chromosome for predicting outcomes of testicular sperm aspiration in azoospermic patients / Y. Deng, F. Jing, N. Zhou [et al.] // *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. – 2014. – V. 34. – N.10. – P. 1469–74.
127. Comparative analysis of three sperm DNA damage assays and sperm nuclear protein content in couples undergoing assisted reproduction treatment / L. Simon, L. Liu, K. Murphy, et al. // *Hum Reprod*. – 2014. – N.29(5). – P.904–17.
128. Comparing Seminal Plasma Biomarkers between Normospermic and azoospermic Men / S. Soudabeh, M.A. Ali, H. Mahshid [et al.] // *J Reprod Infertil*. – 2010. – N.11(1). – P. 39–46.
129. 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, D.A. Mata, R. Ramasamy [et al.] // *Fertil Steril.* – 2015. – N.104(5). – P.1099–103.

130. Comparison of sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection outcome in patients with and without Klinefelter syndrome / M. Sabbaghian, T. Modarresi, H. Hosseinifar [et al.] // *Urology.* – 2014. – N.83(1). – P.107–110.

131. Comparison of sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection outcome in patients with and without Klinefelter syndrome / M. Sabbaghian, T. Modarresi, H. Hosseinifar [et al.] // *Urology.* – 2014. – N.83(1). – P.107–110.

132. Comparison of sperm retrieval and reproductive outcome in azoospermic men with testicular failure and obstructive azoospermia treated for infertility / S.C. Esteves, C. Prudencio, B. Seol [et al.] // *Asian J Androl.* – 2014. – N.16. – P. 602–6.

133. Complete deletion of the AZFb interval from the Y chromosome in an oligozoospermic man / G. Longepied, N. Saut, Aknin-Seifer [et al.] // *J Hum Reprod* 2010. – N.25. – P.2655–63.

134. Conventional testicular sperm extraction combined with the microdissection technique in nonobstructive azoospermic patients: a prospective comparative study / T. Turunc, U. Gul, B. Haydardedeoglu [et al.] // *Fertil Steril.* – 2010. – N.94. – P.2157–60.

135. Conventional versus microdissection testicular sperm extraction for nonobstructive azoospermia / H. Okada, M. Dobashi, T. Yamazaki [et al.] // *J Urol.* – 2002. – N.168. – P. 1063–7.

136. Correlation between DNA defect and sperm-head morphology / N.G. Cassuto, A. Hazout, I. Hammoud [et al.] // *Reprod Biomed Online.* – 2012. – N.24. – P. 211–8.

137. Correlation between testicular sperm extraction outcomes and clinical, endocrine and testicular histology parameters in 120 azoospermic men with normal serum FSH levels / V. Mitchell, G. Robin, F. Boitrelle [et al.] // *Int J Androl.* – 2011. – N.34. – P.299–305.

138. Coward RM. A step-by-step guide to office-based sperm retrieval for obstructive azoospermia / R.M. Coward, J.N. Mills // *Transl Androl Urol.* – 2017. – N.6(4). – P.730–744.
139. Crystal structures of DNA/RNA repair enzymes AlkB and ABH2 bound to dsDNA / C.G. Yang, C. Yi, E.M. Duguid [et al.] // *Nature.* – 2008. – T.452. – N.7190. – P. 961–5.
140. Cytochemical evaluation of sperm than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics / A.R. Talebi, S. Vahidi, A. Aflatoonian [et al.] // *Reproductionm.* – 2010. – N.139(2). – P.287–301.
141. Cytological evaluation of spermatogenesis: a novel and simple diagnostic method to assess spermatogenesis in non-obstructive azoospermia using testicular sperm extraction specimens / M. Hessel, de M. Vries, K.W. D'Hauwers [et al.] // *Andrology.* – 2015. – N.3. – P.481–90.
142. Dabaja A.A. Microdissection testicular sperm extraction: an update / A.A. Dabaja, P.N. Schlegel // *Asian J Androl.* – 2013. – N.15(1). – P.35–9.
143. Deruyver Y. Outcome of microdissection TESE compared with conventional TESE in non-obstructive azoospermia: a systematic review / Y. Deruyver, D. Vanderschueren, Van der F. Aa // *Andrology.* – 2014. – N.2. – P.20–4.
144. Development of genomic reference materials for cystic fibrosis genetic testing / V.M. Pratt, M. Caggana, C. Bridges [et al.] // *J Mol Diagn.* – 2009. – N.11. – P.186–93.
145. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond / G. Barroso, C. Valdespin, E. Vega [et al.] // *Fertil Steril.* – 2009. – N.92. – P. 835–48.
146. Diagnosis of the gr/gr Y chromosome microdeletion does not help in the treatment of infertile American men / P.J. Stahl, A. Mielnik, M. Margreiter [et al.] // *J Urol.* – 2011. – N.185. – P.233–237.
147. Diagnostic value of sperm DNA fragmentation and sperm high-magnification for predicting outcome of assisted reproduction treatment / G. Lopez, R. Lafuente, M.A. Checa [et al.] // *Asian J Androl.* – 2013. – N.15. – P.790–794.

148. Diminished paternity and gonadal function with increasing obesity in Males / E.M. Pauli, R.S. Legro, L.M. Demers [et al.] // *Fertil Steril.* – 2008. – N.90. – P. 346–351.
149. Discrepancy in the frequency of Y chromosome microdeletions among iranian infertile men with azoospermia and severe oligozoospermia / K. Saliminejad, M.R. Sadeghi, K. Kamali [et al.] // *Genet Test Mol Biomarkers.* – 2012. – N.16. – P.931–934.
150. Disruption of pairing and synapsis of chromosomes causes stage-specific apoptosis of male meiotic cells / G. Hamer, I. Novak, A. Kouznetsova [et al.] // *Theriogenology.* – 2008. – T. 69. – N.3. – P. 333–9.
151. Does inhibinB help us to confidently refuse diagnostic testicular biopsy in azoospermia? / M. Moradi, M. Alemi, A. Moradi [et al.] // *Iran J Reprod Med.* – 2012. – N.10(3). – P.243–8.
152. Does sperm DNA fragmentation affect the developmental potential and the incidence of apoptosis following blastomere biopsy? / T. Haghpanah, M. Salehi, M. Ghaffari Novin [et al.] // *Syst Biol Reprod Med.* – 2016. – N.62(1). – P.1–10.
153. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome / C. Avendano, A. Franchi, H. Duran, et al. // *Fertil Steril.* – 2010. – N.94. – P. 549–57.
154. Dohle G.R. Testicular biopsy: clinical practice and interpretation / G.R. Dohle, S. Elzanaty, van N.J. Casteren // *Asian J Androl.* – 2012. – V. 14. – P. 88–93.
155. 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. – N.13(6). – P.539–49.
156. Double-blind Y chromosome microdeletion analysis in men with known sperm parameters and reproductive hormone profiles: microdeletions are specific for spermatogenic failure / C. Krausz, E. Rajpert-De Meyts, L. Frydelund-Larsen [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2001. – N.86. – P.2638–42.

157. Duration of microdissection testicular sperm extraction procedures: relationship to sperm retrieval success / R. Ramasamy, E.S. Fisher, J.A. Ricci [et al.] // *J Urol.* – 2011. – N.185(4). – P.1394–7.
158. Dynamics of histone H2A, H4 and HS1ph during spermatogenesis with a focus on chromatin condensation and maturity of spermatozoa / Z.H. Zhang, S.M. Mu, M.S. Guo [et al.] // *Sci Rep.* – 2016. – N.28.
159. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013 / C. Krausz, L. Hoefsloot, M. Simoni [et al.] // *Andrology.* – 2014. – N.2. – P.5–19.
160. Early versus late maturation arrest: reproductive outcomes of testicular failure / J.W. Weedn, R.C. Bennett, D.M. Fenig [et al.] // *J Urol.* – 2011. – N.186. – P.621–6.
161. EAU guidelines on male infertility / G.R. Dohle, G.M. Colpi, T.B. Hargreave [et al.] // *Eur Urol.* – 2005. – N.48. – P.703–11.
162. Efesoy O. The efficacy of recombinant human follicle-stimulating hormone in the treatment of various types of male-factor infertility at a single university hospital / O. Efesoy, S. Cayan, E. Akbay // *J Androl.* – 2009. – V. 30. – N.6. – P.679–84.
163. Effect of sperm DNA fragmentation on clinical outcomes for Chinese couples undergoing in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection / L.T. Xue, R.X. Wang, B. He [et al.] // *J Int Med Res.* – 2016. – N.44(6). – P.1283–1291.
164. Effect of testicular spermatozoa on embryo quality and pregnancy in patients with non-obstructive azoospermia / Y.S. Park, S.H. Lee, C.K. Lim [et al.] // *Syst Biol Reprod Med.* – 2015. – N.61. – P.300–6.
165. Efficacy of cryopreservation of embryos generated by intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa from frozen testicular tissue / Y.S. Park, M.K. Kim, C.K. Lim [et al.] // *J Assist Reprod Genet.* – 2014. – N.31. – P.1331–6.
166. Efficacy of hyaluronic acid binding assay in selecting motile spermatozoa with normal morphology at high magnification / C.G. Petersen, F.C. Massaro, A.L. Mauri [et al.] // *Reprod Biol Endocrinol.* – 2010. – N.8. – P. 149.

167. Efficacy of varicocelectomy in improving semen parameters: new meta-analytical approach / A. Argawal, F. Deepinder, M. Cocuzza [et al.] // *Urology*. – 2007. – N.70. – P. 532–8.
168. Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences / A. Arpanahi, M. Brinkworth, D. Iles [et al.] // *Genome Res*. – 2009. – N.19. – P.1338–49.
169. Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote / S. Rousseaux, N. Reynoird, E. Escoffier [et al.] // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2008. – N.16. – P.492–503.
170. Establishment of testicular endocrine function impairment during childhood and puberty in boys with Klinefelter syndrome / M.G. Bastida, R.A. Rey, I. Bergadá [et al.] // *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007. – N.67(6). – P.863–70.
171. Esteves S.C. An evidence-based perspective on the role of sperm chromatin integrity and sperm DNA fragmentation testing in male infertility / S.C. Esteves, A. Agarwal, A. Majzoub // *Transl Androl Urol*. – 2017. – N.6(Suppl 4). – P.665–672.
172. Esteves S.C. An update on the clinical assessment of the infertile male / S.C. Esteves, R. Miyaoka, A. Agarwal // *Clinics*. – 2011. – N.66(4). – P.691–700.
173. Esteves S.C. Clinical management of infertile men with nonobstructive azoospermia / S.C. Esteves // *Asian J Androl*. – 2015. – N.17(3). – P.459–70.
174. Esteves S.C. Clinical outcome of intracytoplasmic sperm injection in infertile men with treated and untreated clinical varicocele / S.C. Esteves, F.V. Oliveira, R.P. Bertolla // *J Urol*. – 2010. – V. 184. – N.4. – P. 1442–6.
175. 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. – N.5. – P. 233–43.
176. 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. – N.39. –P. 440.

177. Esteves S.C. Novel concepts in male factor infertility: clinical and laboratory perspectives / S.C. Esteves // *J Assist Reprod Genet.* – 2016. – N.33(10). – P. 1319–1335.
178. Esteves S.C. PESA/TESA/TESE sperm processing / S.C. Esteves, S. Verza Jr. In: Z.P. Nagy, A.C. Varghese, A. Agarwal, editors // *Practical Manual of In Vitro Fertilization.* – 2012. – P. 207–20.
179. 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 (São Paulo).* – 2013. – N.68(Suppl 1). – P.141–50.
180. Esteves S.C. Re: sperm retrieval rates and intracytoplasmic sperm injection outcomes for men with non-obstructive azoospermia and the health of resulting offspring / S.C. Esteves, A. Agarwal // *Asian J Androl.* – 2014. – N.16. – P. 642.
181. Esteves S.C. Sperm retrieval techniques for assisted reproduction / S.C. Esteves, R. Miyaoka, A. Agarwal // *Int Braz J Urol.* – 2011. – N.37. – P. 570–83.
182. Esteves S.C. The azoospermic male: current knowledge and future perspectives / S.C. Esteves, A. Agarwal // *Clinics (Sao Paulo).* – 2013. – V. 68. – N.1. – P. 1–4.
183. European Association of Urology Working Group on Male Infertility. European Association of Urology guidelines on vasectomy / G.R. Dohle, T. Diemer, Z. Kopa [et al.] // *Eur Urol.* – 2012. – V. 61. – P. 159–63.
184. Evaluation of Prognostic Factors and Determinants in Surgical Sperm Retrieval Procedures in Azoospermic Patients / H. Spahovic, Ü. Göktolga, D. Junuzovic [et al.] // *Med Arch.* – 2017. – N.71(4). – P. 243–245.
185. Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion / T. Kazerooni, N. Asadi, L. Jadid [et al.] // *J Assist Reprod Genet.* – 2009. – N.26. – P. 591–6.
186. Evgeni E. Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters / E. Evgeni, K. Charalabopoulos, B. Asimakopoulos // *J Reprod Infertil.* – 2014. – N.15(1). – P. 2–14.

187. Expansion and de novo occurrence of Y chromosome microdeletions occurring via natural vertical transmission in northeastern China / R.L. Dai, L.K. Sun, X. Yang [et al.] // *J. Int. Med. Res.* – 2012. – N.40(3). – P.1182–91.
188. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization / E. Seli, D.K. Gardner, W.B. Schoolcraft [et al.] // *Fertil Steril.* – 2004. – N.82. – P.378–83.
189. Factors influencing sperm retrieval following testicular sperm extraction in nonobstructive azoospermia patients / P. Salehi, M. Derakhshan–Horeh, Z. Nadeali [et al.] // *Clin Exp Reprod Med.* – 2017. – N.44(1). – P.22–27.
190. Fatty acid composition of spermatozoa is associated with BMI and with semen quality / J.M. Andersen, P.O. Rønning, H. Herning // *Andrology.* – 2016. – V. 4. – N.5. – P. 857–65.
191. Fertility in Klinefelter syndrome / H. Lejeune, A. Brosse, Groupe Fertipreserve [et al.] // *Presse Med.* – 2014. – N.43(2). – P.162–70.
192. Fertilization and pregnancy using cryopreserved testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection with azoospermia / T. Ishikawa, M. Shiotani, Y. Izumi [et al.] // *Fertil Steril.* – 2009. – N.92. – P.174–9.
193. Fine needle aspiration vs. mTESE in non–obstructive azoospermia / S. El–Haggag, T. Mostafa, T. Abdel Nasser [et al.] // *Int J Androl.* – 2008. – N.31. – P. 595–601.
194. Flannigan R. Microdissection testicular sperm extraction / R. Flannigan, P.V. Bach, P.N. Schlegel // *Transl Androl Urol.* – 2017. – N.6(4). – P.745–752.
195. Focal spermatogenesis originates in euploid germ cells in classical Klinefelter patients / R.B. Scieurano, C.V. Luna Hisano, M. Rahn [et al.] // *Hum Reprod.* – 2009. – N.24(9). – P.2353–2360.
196. Franken D.R. Can a cumulus cell complex be used to select spermatozoa for assisted reproduction? / D.R. Franken, H.S. Bastiaan // *Andrologia.* – 2009. – N.41.– P.369–76.
197. Fresh motile testicular sperm retrieved from nonobstructive azoospermic patients has the same potential to achieve fertilization and pregnancy via ICSI as

sperm retrieved from obstructive azoospermic patients / S. Kanto, J. Sugawara, H. Masuda [et al.] // *Fertil Steril.* –2008. – N.90(5). – P.2010.e5–7.

198. Fullerton G. Should non-mosaic Klinefelter syndrome men be labelled as infertile in 2009? / G. Fullerton, M. Hamilton, A. Maheshwari // *Hum Reprod.* – 2010. – N.25(3). – P. 588–597.

199. Gardner D.K. Choosing between day 3 and day 5 embryo transfers. Review / D.K.Gardner, B. Balaban // *Clin Obstet Gynecol.* – 2006. – V.49, N1. – P.85-92.

200. Genetic aspects of human male infertility: the frequency of chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in severe male factor infertility / A. Vicdan, K. Vicdan, S. Günalp [et al.] // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 2004. – N.117. – P.49–54.

201. Genetic association between AZF region polymorphism and Klinefelter syndrome / L. Hadjkacem-Loukil, M. Ghorbel, A. Bahloul [et al.] // *Reprod Biomed Online.* – 2009. – N.19(4). – P.547–51.

202. Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia / Dohle G.R., Halley D.J., Van Hemel J.O. [et al.]// *Hum Reprod.* – 2002. – N.17. – P.13–6.

203. Genetic screening for chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in Chinese infertile men / L. Fu, D.K. Xiong, X.P. Ding [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2012. – V.29. – N.6. – P.521–7.

204. Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men / S.S. Hammoud, D.A. Nix, A.O. Hammoud [et al.] // *Hum Reprod.* – 2011. – N.26. – P.2558–69.

205. George B. Endocrine management of male subfertility / B. George, G. Bantwal // *Indian J Endocrinol Metab.* – 2013. – N.17(Suppl 1). – P.32–4.

206. Gharagozloo P. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy / P. Gharagozloo, R.J. Aitken // *Hum Reprod.* – 2011. – N.26(7). – P.1628–40.

207. Gr/gr deletions on Y–chromosome correlate with male infertility: an original study, meta–analyses, and trial sequential analyses / S.K. Bansal, D. Jaiswal, N. Gupta [et al.] // *Sci Rep.* – 2016. – N.15. – P.6.
208. Gudeloglu A. Update in the evaluation of the azoospermic male / A. Gudeloglu, S.J. Parekattil // *Clinics (Sao Paulo).* – 2013. – V.68. – N.1. – P.27–34.
209. Guidelines on Male Infertility / A. Jungwirth, T. Diemer, G.R. Dohle [et al.] // *European Association of Urology.* – 2015. – 42 p.
210. Gunes S. Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility / S. Gunes, M. Al–Sadaan, A. Agarwal // *Reprod Biomed Online.* – 2015. – 31(3). – P.309–19.
211. Hagstrom K.A. Condensin and cohesin: more than chromosome compactor and glue / K.A. Hagstrom, B.J. Meyer // *Nat. Rev. Genet.* – 2003. – T. 4. – N.7. – P. 520–34.
212. Hammoud S. Protamine ratio and the level of histone retention in sperm selected from a density gradient preparation / S. Hammoud, L. Liu, D. Carrell // *Andrologia.* – 2009. – N.41. – P.88–94.
213. Henkel R. TUNEL assay and SCSA determine different aspects of sperm DNA damage / R. Henkel, C.F. P. Hoogendijk, Bouic // *J. Andrologia.* – 2010. – N.42(5). – P. 305–13.
214. High incidence of Y–chromosome microdeletions in gonadal tissues from patients with 45, X/46, XY gonadal dysgenesis / F. Alvarez–Nava, H. Puerta, M. Soto [et al.] // *Fertil Steril.* – 2008. – N.89. – P. 458–60.
215. High prevalence of androgen deficiency and abnormal lipid profile in infertile men with non–obstructive azoospermia / J. Bobjer M., Naumovska, Y.L. Giwercman [et al.] // *Int J Androl.* – 2012. – N.35. – P.688–94.
216. High serum FSH levels in men with nonobstructive azoospermia does not affect success of microdissection testicular sperm extraction / R. Ramasamy, K. Lin, L.V. Gosden [et al.] // *Fertil Steril.* – 2009. – N.92(2). – P.590–3.
217. Higher pregnancy rates using testicular sperm in men with severe oligospermia / A. Mehta, A. Bolyakov, P.N. Schlegel [et al.] // *Fertil Steril.* – 2015. – N.104(6). – P.1382–7.

218. Histological evaluation of the human testis – approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review / R.I. McLachlan, E. Rajpert-De Meyts, C.E. Hoei-Hansen [et al.] // *Hum Reprod.* – 2007. – N.22. – P.2–16.
219. Hotaling J.M. Genetics of male infertility / J.M. Hotaling // *Urol Clin North Am.* – 2014. – N.41(1). – P.1–17.
220. Houwen J. Efficacy of percutaneous needle aspiration and open biopsy for sperm retrieval in men with no obstructive azoospermia / J. Houwen, K. Lundin, B. Soderlund // *Acta Obstet Gynecol Scand.* – 2008. – N.87. – N.10. – P.1003–1008.
221. How successful is repeat testicular sperm extraction in patients with azoospermia? / V. Verhaeghe, G. Verheyen, A. Goossens [et al.] // *Hum Reprod.* – 2006. – N.21. – P.1551–4.
222. How successful is TESE-ICSI in couples with non-obstructive azoospermia? / V. Vloeberghs, G. Verheyen, P. Haentjens [et al.] // *Hum Reprod.* – 2015. – N.30(8). – P.1790–6.
223. Human chorionic gonadotrophin treatment prior to microdissection testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia / K. Shiraishi, C. Ohmi, T. Shimabukuro [et al.] // *Hum Reprod.* – 2012. – N.27(2). – P.331–9.
224. Human sperm DNA integrity in normal and abnormal semen samples and its correlation with sperm characteristics / A.C. Varghese, F.M. Bragais, D. Mukhopadhyay [et al.] // *Andrologia.* – 2009. – N.41(4). – P.207–15.
225. Human spermatozoa ultrastructure assessment in the infertility treatment by assisted reproduction technique / K. Małgorzata, M. Depa-Martynyw, W. Butowska [et al.] // *Arch Androl.* – 2007. – N.53(6). – P.297–302.
226. Hung A.J. Uniform testicular maturation arrest: a unique subset of men with nonobstructive azoospermia / A.J. Hung, P. King, P.N. Schlegel // *J Urol.* – 2007. – N.178. – P.608–12.
227. Hussein A. Evaluation of diagnostic testis biopsy and the repetition of testicular sperm extraction surgeries in infertility patients / A. Hussein // *Fertility and sterility.* – 2013. – N.100. – P.88–93.

228. ICSI using testicular sperm in male hypogonadotrophic hypogonadism unresponsive to gonadotrophin therapy / I. Fahmy, A. Kamal, R. Shamloul [et al.] // *Hum Reprod.* – 2004. – V.19. – N.7. – P.1558–61.
229. Immunoexpression of androgen receptor and nine markers of maturation in the testes of adolescent boys with Klinefelter syndrome: evidence for degeneration of germ cells at the onset of meiosis / A.M. Wikstrom, C.E. Hoei-Hansen, L. Dunkel [et al.] // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* – 2006. – N.92. – P.714–719.
230. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality / H.I. Kort, J.B. Massey, C.W. Elsner [et al.] // *J Androl.* – 2006. – N.27. – P.450–2.
231. Impact of clinical varicocele and testis size on seminal reactive oxygen species levels in a fertile population: a prospective controlled study / M. Cocuzza, K.S. Athayde, A. Agarwal [et al.] // *Fertil Steril.* – 2008. – V.90. – N.4. – P.1103–8.
232. Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature / A.O. Hammoud, M. Gibson, C.M. Peterson [et al.] // *Fertil Steril.* – 2008. – N. 90. – P.897–904.
233. Impact of male obesity on semen quality and serum sex hormones / M. Eskandar, M. Al-Asmari, S. Babu Chaduvula [et al.] // *Adv Urol.* – 2012. – N.2012. – 407601.
234. Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition / N.O. Palmer, H.W. Bakos, T. Fullston [et al.] // *Spermatogenesis.* – 2012. – N.2(4). – P.253–263.
235. 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. Guler, M. Erdem, A. Erdem [et al.] // *Andrologia.* – 2016. – N.48(7). – P.765–73.
236. Impaired spermatogenesis and gr/gr deletions related to Y chromosome haplogroups in Korean men / J. Choi, S.H. Song, C.W. Bak [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – N.7(8).

237. In the era of micro–dissection sperm retrieval (m–TESE) is an isolated testicular biopsy necessary in the management of men with non–obstructive azoospermia? / J. Kalsi, M.Y. Thum, A. Muneer [et al.] // *BJU Int.* – 2012. – N.109(3). – P. 418–24.
238. Increased sperm DNA fragmentation in patients with vasectomy reversal has no prognostic value for pregnancy rate / M. Smit, O.G. Wissenburg, J.C. Romijn [et al.] // *J Urol.* – 2010. – N.183. – P.662–665.
239. Influence of genetic abnormalities on semen quality and male fertility: four–year prospective study / F. Elfateh, R. Wang, Z. Zhang [et al.] // *Iran J Reprod Med.* – 2014. – N.12(2). – P.95–102.
240. Inhibin B and anti–Mullerian hormone as markers of persistent spermatogenesis in men with non–obstructive azoospermia: a meta–analysis of diagnostic accuracy studies / K.A. Toulis, P.K. Iliadou, C.A. Venetis [et al.] // *Hum Reprod Update.* – 2010. – N.16(6). – P. 713–24.
241. Intracytoplasmic sperm injection outcome of ejaculated versus extracted testicular spermatozoa in cryptozoospermic men / I. Ben–Ami, A. Raziel, D. Strassburger, et al. // *Fertil Steril.* – 2013. – N.99(7). – P. 1867–71.
242. Intracytoplasmic sperm injection outcome versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection outcome: a meta–analysis / A. Souza Setti, R.C. Ferreira, Paes de D. Almeida Ferreira Braga [et al.] // *Reprod Biomed Online.* –2010. – N.21. – P.450–5.
243. Intracytoplasmic spermatid injection and in vitro maturation: fact or fiction? / V. Vloeberghs, G. Verheyen, H. Tournaye // *Clinics (Sao Paulo).* – 2013. – N.68 Suppl 1. – P.151–6.
244. Involvement of multimeric protein complexes in mediating the capacitation–dependent binding of human spermatozoa to homologous zonae pellucidae / K.A. Redgrove, A.L. Anderson, M.D. Dun [et al.] // *Dev. Biol.*– 2011.– N.356(2). – P. 460–474.
245. Is sperm DNA damage associated with IVF embryo quality? A systematic review / A. Zini, W. Jamal, L. Cowan [et al.] // *J Assist Reprod Genet.* – 2011. – N.28. – P.391–397.

246. Klami R. Microdissection testicular sperm extraction in Finland – results of the first 100 patients / R. Klami, H. Mankonen, A. Perheentupa // *Acta Obstet Gynecol Scand.* – 2018. – N.97(1). – P.53-58.
247. Klinefelter's syndrome: a clinical and therapeutical update / G. Forti, G. Corona, L. Vignozzi [et al.] // *Sex Dev* 2010. – N.4(4–5). – P.249–58.
248. Klinefelter syndrome and fertility: sperm preservation should not be offered to children with Klinefelter syndrome / S. Franik, Y. Hoeijmakers, K. D'Hauwers [et al.] // *Hum Reprod.* – 2016. – N.31(9). – P.1952–9.
249. Klinefelter syndrome and TESE–ICSI / I. Plotton, A. Brosse, B. Cuzin [et al.] // *Ann Endocrinol (Paris).* – 2014. – N.75(2). – P.118–25.
250. Klinefelter syndrome in adolescence: onset of puberty is associated with accelerated germ cell depletion / A.M. Wikstrom, T. Raivio, F. Hadziselimovic [et al.] // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* – 2004. – N.89. – P.2263–2270.
251. Klinefelter syndrome: does it confer a bad prognosis in treatment of nonobstructive azoospermia? / M.E. Bakircioglu, U. Ulug, H.F. Erden [et al.] // *Fertil Steril.* – 2011. – N.95(5). – P.1696–1699.
252. Klinefelter syndrome (KS): genetics, clinical phenotype and hypogonadism / M. Bonomi, V. Rochira, D. Pasquali [et al.] // *J Endocrinol Invest.* – 2017. – N.40(2). – P. 123–134.
253. Klinefelter's syndrome / F. Lanfranco, A. Kamischke, M. Zitzmann [et al.] // *Lancet.* – 2004. – N.364. – P. 273–83.
254. Krausz C. Genetic testing and counselling for male infertility / C. Krausz, C. Chianese // *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* – 2014. – N.21(3). – P. 244–50.
255. Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis / C. Krausz // *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* – 2011. – N.25(2). – P. 271–85.
256. Learning curves of microdissection testicular sperm extraction for non-obstructive azoospermia / T. Ishikawa, R. Nose, K. Yamaguchi [et al.] // *FertilSteril.* – 2010. – N.94. – P.1008–11.
257. Lee SH, Intracytoplasmic sperm injection may lead to vertical transmission, expansion, and de novo occurrence of Y–chromosome microdeletions in male

fetuses / S.H. Lee, S.Y. Ahn, K.W. Lee [et al.] // *Fertil Steril.* – 2006. – N.85(5). – P. 1512–5.

258. Live birth rates after MESA or TESE in men with obstructive azoospermia: is there a difference? / van M. Wely, N. Barbey, A. Meissner [et al.] // *Hum Reprod.* – 2015. – N.30(4). – P.761–6.

259. Long term effects of micro-surgical testicular sperm extraction on androgen status in patients with nonobstructive azoospermia / K. Everaert, I. De Croo, W. Kerckhaert [et al.] // *BMC Urol.* – 2006. – N.6. – P.9.

260. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring / R. Fernandez-Gonzalez, P.N. Moreira, M. Perez-Crespo [et al.] // *Biol Reprod.* – 2008. – N.78. – P.761–72.

261. Lotti F. Ultrasound of the male genital tract in relation to male reproductive health / F. Lotti, M. Maggi // *Hum Reprod Update.* – 2015. – N.21(1). – P. 56–83.

262. Low semen volume in 47 adolescents and adults with 47, XXY Klinefelter or 46, XX male syndrome / L. Aksglaede, N. Jorgensen, N.E. Skakkebaek [et al.] // *International Journal of Andrology.* – 2009. – N.32. – P. 376–384.

263. Low testosterone associated with obesity and the metabolic syndrome contributes to sexual dysfunction and cardiovascular disease risk in men with type 2 diabetes / C. Wang, G. Jackson, T.H. Jones [et al.] // *Diabetes Care.* – 2011. – N.34(7). – P. 1669–75.

264. Macdonald A.A. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones in New Zealand men: a cross-sectional study in fertility clinics / A.A. Macdonald, A.W. Stewart, C.M. Farquhar // *Hum Reprod.* – 2013. – N.28(12). – P. 3178–87.

265. Male infertility: role of genetic background / A. Ferlin, F. Raicu, V. Gatta [et al.] // *Reprod Biomed Online.* – 2007. – N.14. – P.734–45.

266. Male obesity and alteration in sperm parameters / A.O. Hammoud, N. Wilde, M. Gibson [et al.] // *Fertil Steril.* – 2008. – N.90. – P.2222–2225.

267. McLachlan R.I. Approach to the patient with oligozoospermia / R.I. McLachlan // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2013. – N.98(3). – P. 873–80.

268. McLachlan R.I. Clinical review: State of the art for genetic testing of infertile men / R.I. McLachlan, M.K. O'Bryan // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2010. – N.95(3). – P.1013–24.
269. McLernon D.J. Clinical decision-making in azoospermic men: in search of the ideal prediction model / D.J. McLernon, S. Bhattacharya // *Hum Reprod.* – 2016. – N.31. – P.1931–3.
270. Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis / M. Cissen, M.V. Wely, I. Scholten [et al.] // *PLoS One.* – 2016. – N.11(11).
271. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage / L. Tamburrino, S. Marchiani, M. Montoya [et al.] // *Asian J Androl.* – 2012. – N.14. – P.24–31.
272. Mehta A. Klinefelter syndrome: an argument for early aggressive hormonal and fertility management / A. Mehta, D.A. Paduch // *Fertil Steril.* – 2012. – N.98. – P.274–83.
273. Meiotic abnormalities in patients bearing complete AZFc deletion of Y chromosome / C. Geoffroy-Siraudin, I. Akinin-Seiffer, C. Metzler-Guillemain [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2007. – N.22(6). – P.1567–72.
274. Men's body mass index and infertility / R.H. Nguyen, A.J. Wilcox, R. Skjaerven [et al.] // *Hum Reprod.* – 2007. – N.22. – P. 2488–2493.
275. Men's body mass index in relation to embryo quality and clinical outcomes in couples undergoing in vitro fertilization / D.S. Colaci, M. Afeiche, A.J. Gaskins [et al.] // *Fertil Steril.* – 2012. – N.98(5). – P. 1193–9.
276. Metabolic syndrome in men with Klinefelter syndrome / T. Ishikawa, K. Yamaguchi, Y. Kondo [et al.] // *Urology.* – 2008. – N.71. – P. 1109–13.
277. Microdissection testicular sperm extraction causes spermatogenic alterations in the contralateral testis / A.B. Oliveira Filho, R.S. Souza, M.T. Azeredo-Oliveira [et al.] // *Genet Mol Res.* – 2010. – N.9(3). – P.1405–13.
278. Microdissection testicular sperm extraction in men with Sertoli cell-only testicular histology / B.M. Berookhim, G.D. Palermo, N. Zaninovic [et al.] // *Fertil Steril.* – 2014. – N.102. – P.1282–6.

279. Microsurgical TESE versus conventional TESE for ICSI in non-obstructive azoospermia: a randomized controlled study / G.M. Colpi, E.M. Colpi, G. Piediferro [et al.]// *Reprod Biomed Online*. – 2009. – N.18. – P.315–9.
280. Mihalca R. The impact of obesity on the male reproductive axis / R. Mihalca, S.J. Fica // *Med Life*. – 2014. – N.7(2). – P.296–300.
281. Miller D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics / D. Miller, M. Brinkworth, D. Iles // *Reproduction*. – 2010. – N.139(2). –P.287–301.
282. Miyaoka R. Predictive factors for sperm retrieval and sperm injection outcomes in obstructive azoospermia: do etiology, retrieval techniques and gamete source play a role? / R. Miyaoka, S.C. Esteves // *Clinics (Sao Paulo)*. – 2013. – N.68 Suppl 1. – P. 111–9.
283. Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy / A. Ferlin, B. Arredi, E. Speltra [et al.] // *J Clin Endocrinol Metabol*. – 2007. – N.92. – P.762–770.
284. Molecular and cytogenetic studies of 101 infertile men with microdeletions of Y chromosome in 1,306 infertile Korean men / M.J. Kim, H.W. Choi, S.Y. Park [et al.] // *J Assist Reprod Genet*. – 2012. – N.29(6). – P.539–46.
285. Molecular microdeletion analysis of infertile men with karyotypic Y chromosome abnormalities / Y. Pan, H.G. Zhang, Q.I. Xi [et al.] // *J Int Med Res*. – 2017.
286. Natural course of severe oligozoospermia in infertile male: influence on future fertility potential / S.H. Song, C.W. Bak, J.J. Lim [et al.] // *J Androl*. – 2010. – N.31. – P.536–9.
287. Natural history of seminiferous tubule degeneration in Klinefelter syndrome / L. Aksglaede, A.M. Wikstrom, M.E Rajpert-De. [et al.] // *Human Reproduction Update*. – 2006. – N.12. – P.39–48.
288. Navarro-Costa P. The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility / P. Navarro-Costa, J. Gonçalves, C.E. Plancha // *Hum Reprod Update*. – 2010. – V.16. – N.5. – P.525–542.

289. Nicopoulos J.D.M. Does the cause of obstructive azoospermia affect the outcome of intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis / J.D.M. Nicopoulos, C. Gilling-Smith, J.W.A. Ramsay // *BJU Int.* – 2004. – N.93(9). – P.1282–6.
290. No relationship between biopsy sites near the main testicular vessels or rete testis and successful sperm retrieval using conventional or microdissection biopsies in 220 non-obstructive azoospermic men / J.U. Schwarzer, H. Steinfatt, M. Schleyer // *Asian J Androl.* – 2013. – N.15(6). – P.795–798.
291. Oates R. Adolescent Klinefelter syndrome: is there an advantage to testis tissue harvesting or not? / R. Oates // *F1000Res.* 2016. – pii: F1000 Faculty Rev-1595.
292. Oates R.D. Sperm retrieval in adolescents with Klinefelter syndrome / R.D. Oates // *Fertil Steril.* – 2013. – V. 100. – N.4. –P.943–944.
293. Oates R.D. The natural history of endocrine function and spermatogenesis in Klinefelter syndrome: what the data show / R.D. Oates // *Fertil Steril.* – 2012. – N.98(2). – P.266–73.
294. Obesity and increased risk for oligozoospermia and azoospermia / N. Sermondade, C. Faure, L. Fezeu [et al.] // *Arch Intern Med.* – 2012. – N.172. – P.440–2.
295. Obesity and male infertility: a practical approach / A.O. Hammoud, A.W. Meikle, L.O. Reis [et al.] // *Semin Reprod Med.* – 2012. – N.30. – P.486–495.
296. Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients / C. Dupont, C. Faure, N. Sermondade [et al.] // *Asian J Androl.* – 2013. – N.15(5). – P.622–5.
297. Obesity: modern man's fertility nemesis / S. Cabler, A. Agarwal, M. Flint [et al.] // *Asian J Androl.* – 2010. – N.12(4). – P. 480–489.
298. Okada Y. Histone demethylase JHDM2A is involved in male infertility and obesity / Y. Okada, K. Tateishi, Y. Zhang // *J Androl.* – 2010. – N.31. – P.75–78.
299. Oliva R. Protamines and male infertility / R. Oliva // *Hum Reprod Update.* – 2006. – N.12(4). – P.417–35.

300. Optimization of spermatogenesis–regulating hormones in patients with non–obstructive azoospermia and its impact on sperm retrieval: a multicentre study / A. Hussein, Y. Ozgok, L. Ross [et al.] // *BJU Int.* – 2013. – N.111. – P.110–114.
301. Outcome of cycles of oocyte in vitro maturation requiring testicular sperm extraction for nonobstructive azoospermia / R. Fadini, E. Colpi, M. Mignini Renzini [et al.] // *Fertil Steril* – 2011. – N. 96. – P. 321–323.
302. Outcome of intracytoplasmic sperm injection cycles with fresh testicular spermatozoa obtained on the day of or the day before oocyte / M. Karacan, F. Alwaeely, S. Erkan [et al.] // *Fertil Steril.* – 2013. – N.100(4). – P. 975–80.
303. Outcome of intracytoplasmic sperm injection using fresh and cryopreserved–thawed testicular spermatozoa in 83 azoospermic men with Klinefelter syndrome / K. Vicdan, C. Akarsu, E. Sözen [et al.] // *J Obstet Gynaecol Res.* – 2016. – N.42(11). – P.1558–1566.
304. Outcome of varicocele repair in men with nonobstructive azoospermia: systematic review and meta–analysis / S.C. Esteves, R. Miyaoka, M. Roque [et al.] // *Asian J Androl.* – 2016. – V.18. – N.2. – P.246–53.
305. Outcomes after testicular aspiration and testicular tissue cryopreservation for obstructive azoospermia and ejaculatory dysfunction / T. Garg, C. LaRosa, E. Strawn [et al.] // *J Urol.* – 2008. – V.180. – N.6. – P.2577–80.
306. Outcomes of microdissection testicular sperm extraction in men with nonobstructive azoospermia due to maturation arrest / A.M. Bernie, K. Shah, J.A. Halpern [et al.] // *Fertil Steril.* – 2015. – N.104. – P.569–73.
307. Overweight men: clinical pregnancy after ART is decreased in IVF but not in ICSI cycles / J. Keltz, A. Zapantis, S.K. Jindal [et al.] // *J Assist Reprod Genet.* – 2010. – N.27. – P. 539–44.
308. Partial AZFc deletions and duplications: clinical correlates in the Italian population / C. Giachini, I. Laface, E. Guarducci [et al.] // *Hum Genet.* – 2008. – N.124(4). – P.399–410.
309. Partial AZFc duplications not deletions are associated with male infertility in the Yi population of Yunnan Province, China / J.J. Ye, L. Ma, L.J. Yang [et al.] // *J Zhejiang Univ Sci B.* – 2013. – N.14(9). – P. 807–815.

310. Partial AZFc region deletions of the Y chromosome in spermatogenic dysfunction patients / X.W. Cong, X.D. Tu, A.Z. Yan [et al.] // *Zhonghua Nan Ke Xue.* – 2010. – N.16(7). – P. 594–98.
311. Partial deletions are associated with an increased risk of complete deletion in AZFc: a new insight into the role of partial AZFc deletions in male infertility / F. Zhang, C. Lu, Z. Li [et al.] // *J Med Genet.* – 2007. – N.44(7). – P. 437–44.
312. Partial Deletions of Y–Chromosome in Infertile Men with Non–obstructive Azoospermia and Oligoasthenoteratozoospermia in a Turkish Population / C.C. Beyaz, S. Gunes, K. Onem [et al.] // *In Vivo.* – 2017. – N.31(3). – P. 365–371.
313. Partial duplication at AZFc on the Y chromosome is a risk factor for impaired spermatogenesis in Han Chinese in Taiwan / Y.W. Lin, L.C. Hsu, P.L. Kuo [et al.] // *Hum Mutat.* – 2007. – V.28. – N.5. – P.486–494.
314. Paternal body mass index is associated with decreased blastocyst development and reduced live birth rates following assisted reproductive technology / H.W. Bakos, R.C. Henshaw, M. Mitchell [et al.] // *Fertil Steril.* – 2011. – N.95. – P.1700–4.
315. Pheno–typic differences in mosaic Klinefelter patients as compared with non–mosaic Klinefelter patients / M.K. Samplaski, K.C. Lo, E.D. Grober [et al.] // *Fertil Steril.* – 2014. – N.101(4). – P.950–5.
316. Phenotypic variation within European carriers of the Y–chromosomal gr/gr deletion is independent of Y–chromosomal background / C. Krausz, C. Giachini, Y. Xue [et al.] // *J Med Genet.* – 2009. – N.46(1). – P. 21–31.
317. Pigozzi M.I. Localization of single–copy sequences on chicken synaptonemal complex spreads using fluorescence in situ hybridization (FISH) / M.I. Pigozzi // *Cytogenet. Genome Res.* – 2007. – N.119. – P.105–112.
318. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in Collaboration with Society for Male Reproduction and cUrology. Evaluation of the azoospermic male / *Fertil Steril.* – 2008. – N.90. – P.74–7.
319. Prediction model for live birth in ICSI using testicular extracted sperm / A.M. Meijerink, M. Cissen, M.H. Mochtar [et al.] // *Hum Reprod.* – 2016. – N.31. – P.1942–51.

320. Prediction model for obtaining spermatozoa with testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia / M. Cissen, A.M. Meijerink, K.W. D'Hauwers [et al.] // *Hum Reprod.* – 2016. – N.31. – P. 1934–41.
321. Prediction of successful sperm retrieval in patients with nonobstructive azoospermia / S.A. Ziaee, M. Ezzatnegad, M. Nowroozi [et al.] // *Urol J.* – 2006. – N.3. – P. 92–96.
322. Predictive value of semen parameters in vitro fertilization pregnancy outcome / X. Chen, W. Zhang, Y. Luo [et al.] // *Andrologia.* – 2009. – N.41. – P. 111–117.
323. Predictors for successful sperm retrieval of salvage microdissection testicular sperm extraction (TESE) following failed TESE in nonobstructive azoospermia patients / T. Xu, L. Peng, X. Lin [et al.] // *Andrologia.* – 2017. – N.49(4).
324. Pregl Breznik B. Are sperm DNA fragmentation, hyperactivation, and hyaluronan-binding ability predictive for fertilization and embryo development in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection? / B. Pregl Breznik, B. Kovačić, V. Vlajsavljević // *Fertil Steril.* – 2013. – N.99(5). – P.1233–41.
325. Pregnancies achieved by testicular sperm recovery in male hypogonadotropic hypogonadism with persistent azoospermia / C. Akarsu, G. Caglar, K. Vicdan [et al.] // *Reprod Biomed Online.* – 2009. – N.18(4). – P.455–9.
326. Pregnancy and live birth after follicle-stimulating hormone treatment for an infertile couple including a male affected by Sertoli cell-only syndrome / G. Paulis, L. Paulis, G. Romano [et al.] // *Res Rep Urol.* – 2017. – N.9. – P.203–208.
327. Pregnancy outcomes of reciprocal translocation carriers who have a history of repeated pregnancy loss / N. Ozawa, T. Maruyama, T. Nagashima [et al.] // *Fertil Steril.* – 2008. – N.90(4). – P.1301–4.
328. Pregnancy prediction by free sperm DNA and sperm DNA fragmentation in semen specimens of IVF/ICSI-ET patients / T. Bounartzi, K. Dafopoulos, G. Anifandis [et al.] // 2016. – N.19(1). – P.56–62.
329. Prevalence of chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletion among men with severe semen abnormalities and its correlation with successful

- sperm retrieval / M. Mascarenhas, S. Thomas, M.S. Kamath [et al.] // *J Hum Reprod Sci.* – 2016. – N.9(3). – P.187–193.
330. Prevalence of Y chromosome microdeletions in infertile Tunisian me. / W. Hammami, O. Kilani, M. Ben Khelifa [et al.] // *Ann Biol Clin (Paris).* – 2014. – N.72(3). – P. 331–6.
331. Probability of sperm recovery in nonobstructive azoospermic patients presenting with testes volume less than 10 ml/FSH level exceeding 20 mIU/ml. / H. Hibi, T. Ohori, Y. Yamada [et al.] // *Arch Androl.* – 2005. – N.51(3). – P. 225–31.
332. Progressive depletion of germ cells in a man with nonmosaic Klinefelter's syndrome: optimal time for sperm recovery / Y.M. Lin, W.J. Huang, J.S. Lin [et al.] // *Urology.* – 2004. – N.63. – P. 380–381.
333. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity / V.W. Aoki, B.R. Emery, L. Liu [et al.] // *J Androl.* – 2006. – N.27. – P. 890–8.
334. Proteomic and functional analysis of human sperm detergent resistant membranes / B. Nixon, L.A. Mitchell, A.L. Anderson [et al.] // *J. Cell Physiol.* – 2011. – N.226(10). – P. 2651–2665.
335. Ramasamy R. Medical therapy for spermatogenic failure / R. Ramasamy, P.J. Stahl, P.N. Schlegel // *Asian J Androl.* – 2012. – N.14. – P. 57–60.
336. 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. – N.65. – P.1190–4.
337. Ran R. Innovations in surgical management of nonobstructive azoospermia / T.P. Kohn, R. Ramasamy, J. Indian // *Urol.* – 2016. – 32(1). – P. 15–20.
338. Recent advances in the genetics of testicular failure / S.H. Song, K. Chiba, R. Ramasamy [et al.] // *Asian J Androl.* – 2016. – N.18(3). – P. 350–5.
339. Relationship between conventional sperm parameters and motile sperm organelle morphology examination (MSOME) / A. Perdrix, R. Saïdi, J.F. Ménard [et al.] // *International Journal of Andrology.* – 2012. – N.35(4). –P. 491–498.

340. Relationship between follicle stimulating hormone and AZF microdeletion on Y chromosome in patients with Azoospermia or severe Oligozoospermia / X.Q. Wang, H.Y. Zhang, Q.W. Qi [et al.] // *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* – 2011. – N.28. – P.559–61.
341. Relationship between human sperm–hyaluronan binding assay and fertilization rate in conventional in vitro fertilization / Hong Ye, Guo–ning Huang, Yang Gao [et al.] // *Human Reproduction.* – 2006. – V.21. – N.6.– P.1545–1550.
342. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes / L. Simon, J. Castillo, R. Oliva [et al.] // *Reprod Biomed Online.* – 2011. – N.23(6). – P.724–34.
343. Relationship of genetic causes and inhibin B in non obstructive azoospermia spermatogenic failure / Q.J. Chu, R. Hua, C. Luo [et al.] // *BMC Med Genet.* – 2017. – V. 18. – N. 1. – P. 98.
344. Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa / U. Brykczynska, M. Hisano, S. Erkek [et al.] // *Nat Struct Mol Biol.* – 2010. – N.17(6). – P.679–87.
345. Reproductive outcomes of testicular versus ejaculated sperm for intracytoplasmic sperm injection among men with high levels of DNA fragmentation in semen: systematic review and meta–analysis / S.C. Esteves, M. Roque, C.K. Bradley [et al.] // *Fertil Steril.* – 2017. – N.108(3). – P. 456–467.
346. Reproductive potential of men with obstructive azoospermia undergoing percutaneous sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection according to the cause of obstruction / S.C. Esteves, W. Lee, D.J. Benjamin [et al.] // *J Urol.* – 2013. – N.189. – P. 232–7.
347. Rescue of spermatogenesis arrest in azoospermic men after long–term gonadotropin treatment / H. Selman, De M. Santo, K. Sterzik [et al.] // *Fertil Steril.* –2006. – N.86(2). – P. 466–8.
348. Review of Azoospermia / M. Wosnitzer, M. Goldstein, M.P. Hardy // *Spermatogenesis.* – 2014. – N.4.
349. Rex A.S. DNA fragmentation in spermatozoa: a historical review / A.S. Rex, J. Aagaard, J. Fedder // *Andrology.* – 2017. – N.5(4). – P.622–630.

350. Rives N.Y. Chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis, patient approach and genetic counseling / N.Y. Rives // *Ann Endocrinol.* – 2014. – N.75(2). – P.112–114.
351. Rogol A.D. Sperm retrieval in adolescent males with Klinefelter syndrome: medical and ethical issues / A.D. Rogol, N.E. Skakkebaek // *Transl Pediatr.* – 2016. – N.5. – P.104–6.
352. Role of optimizing testosterone before microdissection testicular sperm extraction in men with nonobstructive azoospermia / J.E. Reifsnyder, R. Ramasamy, J. Hussein [et al.] // *J Urol.* – 2012. – N.188. – P.532–6.
353. Role of tissue digestion and extensive sperm search after microdissection testicular sperm extraction / R. Ramasamy, J.E. Reifsnyder, C. Bryson [et al.] // *Fertil Steril.* – 2011. – N.96. – P.299–302.
354. Routine screening for classical azoospermia factor deletions of the Y chromosome in azoospermic patients with Klinefelter syndrome / J.H. Choe, J.W. Kim, J.S. Lee [et al.] // *Asian J Androl.* – 2007. – N.9(6). – P.815–20.
355. Sadeghi-Nejad H. Genetics of azoospermia: current knowledge, clinical implications, and future directions. Part II: Y chromosome microdeletions / H. Sadeghi-Nejad, F. Farrokhi // *J Urol.* – 2007. – V.4. – N.4. – P.192–206.
356. Sakkas D. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis / D. Sakkas, J.G. Alvarez // *Fertil Steril.* – 2010. – N.93. – P.1027–36.
357. Salvage microdissection testicular sperm extraction after failed conventional testicular sperm extraction in patients with nonobstructive azoospermia / A. Tsujimura, Y. Miyagawa, T. Takao [et al.] // *J Urol.* – 2006. – N.175. – P.1446–9.
358. Salvage microdissection testicular sperm extraction; outcome in men with nonobstructive azoospermia with previous failed sperm retrievals / J.S. Kalsi, P. Shah, Y. Thum [et al.] // *BJU Int.* – 2015. – N.116(3). – P. 460–5.
359. Schiff J.D., Success of testicular sperm extraction [corrected] and intracytoplasmic sperm injection in men with Klinefelter syndrome / J.D. Schiff, G.D. Palermo, L.L. Veeck [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2005. – N.90. – P.6263–7.

360. Schlegel P.N. Microdissection testicular sperm extraction (TESE) in non-obstructive azoospermia / P.N. Schlegel, A. Tanrikut, P.S. Li // *Fertil Steril.* – 2006. – N.86. – P. 519.
361. Schlegel P.N. Nonobstructive azoospermia: a revolutionary surgical approach and results / P.N. Schlegel // *Semin Reprod Med.* – 2009. – N.27. – P.165–70.
362. Schlegel P.N. Physiological consequences of testicular sperm extraction / P.N. Schlegel, L.M. Su // *Hum Reprod.* – 1997. – N.12. – P.1688–92.
363. Schlegel P.N. Successful repeat microdissection testicular sperm extraction in men with nonobstructive azoospermia / R. Ramasamy, J.A. Ricci, R.A. Leung [et al.] // *J Urol.* – 2011. – N.185. – P. 1027–31.
364. Schlegel P.N. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision / P.N. Schlegel // *Hum Reprod.* – 1999. – N.14. – P.131–5.
365. Sciurano R.B. Ultrastructural and immunofluorescent methods for the study of the XY body as a biomarker / R.B. Sciurano, A.J. Solari // *Methods Mol Biol.* – 2014. – N.1094. – P. 137–149.
366. Screening and clinical phenotype analysis of microdeletions of azoospermia factor region on Y chromosome in 1011 infertile men / L. Fu, X.P. Ding, M.J. Shen [et al.] // *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* – 2012. – N.29(2). – P. 184–7.
367. Screening for partial AZFa microdeletions in the Y chromosome of infertile men: is it of clinical relevance? / S.E. Kleiman, R. Almog, L. Yogev [et al.] // *Fertil Steril.* – 2012. – N.98. – P. 43–7.
368. Seasonal changes of neutral alpha-glucosidase activity in human semen / R. Henkel, G. Maass, H.C. Schuppe [et al.] // *J Androl.* – 2006. – N.27(1). – P. 34–9.
369. Semen parameters and hormonal profile in obese fertile and infertile males. / E.R. Hofny, M.E. Ali, H.Z. Abdel-Hafez [et al.] // *Fertil Steril.* – 2010. – N.94(2). – P. 581–4.
370. Seminal plasma anti-Müllerian hormone level correlates with semen parameters but does not predict success of testicular sperm extraction (TESE) / T.

- Mostafa, M.K. Amer, G. Abdel–Malak [et al.] // *Asian J Androl.* – 2007. – N.9(2). –P. 265–70.
371. Seminal plasma concentrations of Anti–Müllerian hormone and inhibin B predict motile sperm recovery from cryopreserved semen in asthenozoospermic men: a prospective cohort study / S.F. Nery, M.A. Vieira, C. Dela Cruz [et al.] // *Andrology.* – 2014. – N.2(6). – P. 918–23.
372. Seminal plasma levels of anti–Müllerian hormone and inhibin B are not predictive of testicular sperm retrieval in nonobstructive azoospermia: a study of 139 men / V. Mitchell, F. Boitrelle, P. Pigny [et al.] // *Fertil Steril.* – 2010. – N.94(6). – P. 2147–50.
373. Serial follow–up study of serum testosterone and antisperm antibodies in patients with non–obstructive azoospermia after conventional or microdissection testicular sperm extraction / K. Komori, A. Tsujimura, H. Miura [et al.] // *Int J Androl.* –2004. – N.27. – P.32–6.
374. Serum anti–Müllerian hormone and inhibin B in disorders of spermatogenesis / S. Muttukrishna, H. Yussoff, M. Naidu [et al.] // *Fertil Steril* 2007. – N.88(2). – P.516–8.
375. Serum inhibin B concentration as a prognostic factor for prediction of sperm retrieval in testis biopsy of patients with azoospermia / M.R. Nowroozi, K. Radkhah, M. Ayati [et al.] // *Arch Iran Med.* – 2008. – N.11. – P.54–56.
376. Serum inhibin–B and follicle stimulating hormone as predictors of the presence of sperm in testicular fine needle aspirate in men with azoospermia / D.G. Goulis, P. Polychronou, T. Mikos [et al.] // *Hormones.* – 2008. – N.7. – P.140–7.
377. Serum testosterone levels and other determinants of sperm retrieval in microdissection testicular sperm extraction / S.A. Althakafi, O.M. Mustafa, R.M. Seyam [et al.] // *Transl Androl Urol.* –2017. – N.6(2). – P. 282–287.
378. Serum testosterone levels in patients with nonmosaic Klinefelter syndrome after testicular sperm extraction for intracytoplasmic sperm / H. Okada, T. Shirakawa, T. Ishikawa [et al.] // *Fertil Steril.* – 2004.– V. 82. – N.1. – P. 237–8.

379. Seven pregnancies and deliveries from non-mosaic Klinefelter syndrome patients using fresh and frozen testicular sperm / K. Kyono, H. Uto, Y. Nakajo [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2007. – N.24. – P.47–51.
380. Severe testicular atrophy does not affect the success of microdissection testicular sperm extraction / C.F. Bryson, R. Ramasamy, M. Sheehan [et al.] // *J Urol*. – 2014. – N.191(1). –P. 175–8.
381. Shah R. Surgical sperm retrieval: Techniques and their indications / R. Shah // *Indian J Urol*. – 2011. – N.27(1). – P.102–9.
382. Shamsi M.B. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction / M.B. Shamsi, R. Kumar, R. Dada // *Indian J Med Res*. – 2008. – N.127. – P. 1115–23.
383. Shefi S. Analysis of spermatogenesis in non-obstructive azoospermic and virtually azoospermic men with known testicular pathology / S. Shefi, K. Kaplan, P.J. Turek // *Reprod Biomed Online*. – 2009. – N.18. – P.460–4.
384. 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. – N.1. – P. 929–35.
385. Significance of inhibin B and anti-Müllerian hormone in seminal plasma: a preliminary study / E. Duvilla, H. Lejeune, B. Trombert-Paviot [et al.] // *Fertil Steril*. –2008. – N.89(2). – P. 444–8.
386. Simoni M. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004 / M. Simoni, E. Bakker, C. Krausz // *Int J Androl*. – 2004. – N.27. – P. 240–9.
387. Singh K. Human male infertility: a complex multifactorial phenotype / K. Singh, D. Jaiswal // *Reprod Sci*. –2011. – N.18(5). –P. 418–425.
388. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects / J. Erenpreiss, M. Spano, J. Erenpreisa [et al.] // *Asian J Androl*. – 2006. – N.8. – P. 11–29.

389. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques / K.L. Larson, C.J. DeJonge, A.M. Barnes [et al.] // *Hum Reprod.* – 2000. – N.15. – P. 1717–22.
390. Sperm DNA damage: correlation to severity of semen abnormalities / S.I. Moskovtsev, J. Willis, J. White [et al.] // *Urology.* – 2009. – N.74(4). – P. 789–93.
391. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis / A. Zini, J.M. Boman, E. Belzile [et al.] // *Hum Reprod.* – 2008. – N.23. – P.2663–2668.
392. Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success / L. Simon, D. Lutton, J. McManus [et al.] // *Fertil Steril.* – 2011. – N.95. – P.652–657.
393. Sperm DNA fragmentation index and pregnancy outcome after IVF or ICSI: a meta-analysis / Z. Zhang, L. Zhu, H. Jiang [et al.] // *J Assist Reprod Genet.* – 2015. – N.32. – P.17–26.
394. Sperm DNA fragmentation levels in testicular sperm samples from azoospermic males as assessed by the sperm chromatin dispersion (SCD) test / M. Meseguer, R. Santiso, N. Garrido [et al.] // *Fertil Steril.* – 2009. – N.92. – P.1638–45.
395. Sperm DNA fragmentation measured by Halosperm does not impact on embryo quality and ongoing pregnancy rates in IVF/ICSI treatments / G. Anifandis, T. Bounartzi, C.I. Messini [et al.] // *Andrologia.* – 2015. – N.47. – P.295–302.
396. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART / A. Borini, N. Tarozzi, D. Bizzaro [et al.] // *Hum Reprod.* – 2006. – N.21. – P.2876–2881.
397. Sperm DNA fragmentation testing: a cross sectional survey on current practices of fertility specialists / A. Majzoub, A. Agarwal, C.L. Cho [et al.] // *Transl Androl Urol.* – 2017. – N.6(Suppl 4) – P.710–719.
398. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome / M. Bungum, P. Humaidan, A. Axmon [et al.] // *Hum Reprod.* – 2007. – N.22. – P.174–179.

399. Sperm nuclear vacuoles, as assessed by motile sperm organellar morphological examination, are mostly of acrosomal origin / O. Kacem, C. Sifer, V. Barraud–Lange [et al.] // *Reprod Biomed Online*. – 2010. – N.20. – P.132–7.
400. Sperm nucleus decondensation, hyaluronic acid (HA) binding and oocyte activation capacity: different markers of sperm immaturity? Case reports / A. Junca, B. Gonzalez Marti, E. Tosti [et al.] // *J Assist Reprod Genet*. – 2012. – N.29. – P.353–5.
401. Sperm quality decline among men below 60 years of age undergoing IVF or ICSI treatment / F. Hammiche, J.S. Laven, J.C. Boxmeer [et al.] // *J Androl*. – 2011. – V. 32. – P. 70–6.
402. Sperm retrieval and live birth rates in presumed Sertoli–cell–only syndrome in testis biopsy: a single centre experience / U. Gul, T. Turunc, B. Haydardedeoglu [et al.] // *Andrology*. – 2013. – N.1(1). – P. 47–51.
403. Sperm retrieval and the predictive parameter of non–obstructive azoospermia: a meta–analysis of literatures 1990 to 2008 / J. Yang, J.H. Liu, X.F. Zou [et al.] // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. – 2008. – N.88. – P.2131–5.
404. Sperm Retrieval in Adolescents and Young Adults with Klinefelter Syndrome: A Prospective, Pilot Study / L. Nahata, R.N. Yu, H.J. Paltiel [et al.] // *J Pediatr*. – 2016. – N.170. – P.260–5.
405. Sperm retrieval rates (SRR) in nonobstructive azoospermia (NOA) are related to testicular histopathology results but not to the etiology of azoospermia / S.C. Esteves, S. Verza, C. Prudencio [et al.] // *Fertil Steril*. – 2010. – N.94(Suppl). –P.132.
406. Sperm retrieval rates in subgroups of primary azoospermic males / S.J. Bromage, D.A. Falconer, B.A. Lieberman [et al.] // *Eur Urol*. – 2007. – N.51. – P. 534–9.
407. Spermatogenesis affects the outcome of ICSI for azoospermic patients rather than sperm retrieval method / X. He, Y. Cao, Z. Zhang [et al.] // *Syst Biol Reprod Med*. – 2010. – N.56. – P.457–64.
408. Spermatogenesis in a man with complete deletion of USP9Y / A. Luddi, M. Margollicci, L. Gambera [et al.] // *N Engl J Med*. – 2009. – N.360. – P.881–5.

409. Stahl P.J. Genetic evaluation of the azoospermic or severely oligozoospermic male / P.J. Stahl, P.N. Schlegel // *Curr Opin Obstet Gynecol.* – 2012. – N.24(4). – P.221–8.
410. Subfecundity in overweight and obese couples / C.H. Ramlau–Hansen, A.M. Thulstrup, E.A. Nohr [et al.] // *Hum Reprod.* – 2007. – N.22. – P.1634–1637.
411. Success of testicular sperm extraction [corrected] and intracytoplasmic sperm injection in men with Klinefelter syndrome / J.D. Schiff, G.D. Palermo, L.L. Veeck [et al.] // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* – 2005. – N.90. – P.6263–6267.
412. Successful fertility treatment for Klinefelter's syndrome / R. Ramasamy, J.A. Ricci, G.D. Palermo [et al.] // *J Urol.* – 2009. – N.182. – P.1108–13.
413. Successful repeat microdissection testicular sperm extraction in men with nonobstructive azoospermia / R. Ramasamy, J.A. Ricci, R.A. Leung [et al.] // *J Urol.* – 2011. – N.185(3). – P.1027–31.
414. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes / L. Hermo, R.M. Pelletier, D.G. Cyr [et al.] // *Microsc. Res. Tech.* – 2010. – T.73. – N.4. – P.241–78.
415. SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination / E. Bolcun–Filas, Y. Costa, R. Speed [et al.] // *J. Cell Biol.* – 2007. – T.176. – N.6. – P.741–7.
416. Tahmasbpour E. A multi–faceted approach to understanding male infertility: gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART) / E. Tahmasbpour, D. Balasubramanian, A. Agarwal // *J Assist Reprod Genet.* – 2014. – N.31(9). – P.1115–1137.
417. Techniques for surgical retrieval of sperm prior to ICSI for azoospermia / A. Van Peperstraten, M.L. Proctor, N.P. Johnson [et al.] // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2006. – N.3.
418. TESE–ICSI in patients with non–mosaic Klinefelter syndrome: a comparative study / H. Yarali, M. Polat, G. Bozdog // *Reprod Biomed Online.* – 2009. – N.18(6). – P.756–760.

419. Testicular fine needle aspiration versus testicular open biopsy: comparable sperm retrieval rate in selected patients / M.R. Nowroozi, H. Ahmadi, M. Ayati [et al.] // *Indian J Urol.* – 2012. – N.28. – P.37–42.
420. Testicular histology may predict the successful sperm retrieval in patients with non-obstructive azoospermia undergoing conventional TESE: a diagnostic accuracy study / E. Caroppo, E.M. Colpi, G. Gazzano [et al.] // *J Assist Reprod Genet.* – 2017. – N.34. – P.149–54.
421. Testicular histopathology as a predictor of a positive sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia / A. Abdel Raheem, G. Garaffa, N. Rushwan [et al.] // *BJU Int.* – 2013. – N.111(3). – P.492–9.
422. Testicular sperm aneuploidy in non-obstructive azoospermic patients / M. Vozdova, J. Heracek, V. Sobotka [et al.] // *Hum Reprod.* – 2012. – N.27. – P.2233–9.
423. Testicular spermatozoa have statistically significantly lower DNA damage compared with ejaculated spermatozoa in patients with unsuccessful oral antioxidant treatment / S.I. Moskovtsev, K. Jarvi, J.B. Mullen [et al.] // *Fertil Steril.* – 2010. – N.93(4). – P.1142–6.
424. The b2/b3 subdeletion shows higher risk of spermatogenic failure and higher frequency of complete AZFc deletion than the gr/gr subdeletion in a Chinese population / C. Lu, J. Zhang, Y. Li [et al.] // *Human molecular genetics.* – 2009. – N.18(6). – P.1122–1130.
425. The BMI of men and not sperm parameters impact on embryo quality and the IVF outcome / G. Anifandis, K. Dafopoulos, C.I. Messini [et al.] // *Andrology.* – 2013. – N.1(1). – P.85–9.
426. The chaperonin containing TCP1 complex (CCT/TRiC) is involved in mediating sperm–oocyte interaction / M.D. Dun, N.D. Smith, M.A. Baker [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011. – N.286(42). – P.36875–36887.
427. The clinical significance of sperm DNA damage detection combined with routine semen testing in assisted reproduction / Y. Zhang, H. Wang, L. Wang [et al.] // *Mol Med Rep.* – 2008. – N.1. – P.617–624.

428. The effect of obesity on sperm disorders and male infertility / S.S. Du Plessis, S. Cabler, D.A. McAlister, et. al. // *Nat Rev Urol.* – 2010. – N.7. – P.153–161.
429. The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis / A. Osman, H. Alsomait, S. Seshadri [et al.] // *Reprod Biomed Online.* – 2015. – N.30. – P. 120–127.
430. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis / L. Robinson, I.D. Gallos, S.J. Conner [et al.] // *Hum Reprod.* – 2012. – N.27(10). – P.2908–17.
431. The feasibility of fertility preservation in adolescents with Klinefelter syndrome / N. Rives, J.P. Milazzo, A. Perdrix [et al.] // *Hum Reprod.* – 2013. – N.28(6). – P.1468–79.
- The genetic causes of male factor infertility: A review / K.L. O’Flynn O’Brien, C. Varghese [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2010. – N.93(1). – P.1–12.
433. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis / A.A. MacDonald, G.P. Herbison, M. Showell [et al.] // *Hum Reprod Update.* – 2010. – N.16(3). – P.293–311.
434. The impact of male overweight on semen quality and outcome of assisted reproduction / L. Thomsen, P. Humaidan, L. Bungum [et al.] // *Asian J Androl.* – 2014. – N.16. – P.749–54.
435. The importance of the one carbon cycle nutritional support in human male fertility: a preliminary clinical report / M. Dattilo, D. Cornet, E. Amar [et al.] // *Reprod Biol Endocrinol.* – 2014. – N.12. – P.71.
436. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine: Sperm retrieval for obstructive azoospermia / *Fertil Steril.* – 2008. – N.90(5 Suppl): P.213–8.
437. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI / M. Bungum, P. Humaidan, M. Spano [et al.] // *Hum Reprod.* – 2004. – N.19. – P. 1401–8.

438. The prevalence and diagnosis rates of Klinefelter syndrome: an Australian comparison / A.S. Herlihy, J.L. Halliday, M.L. Cock [et al.] // *Med J Aust.* – 2011. – N.194(1). – P. 24–8.
439. The relationship between body mass index, semen and sex hormones in adult male / J.N. Egwurugwu, A. Nwafor, C.P. Chike [et al.] // *Niger J Physiol Sci.* – 2011. – N.26. – P.29–34.
440. The relationship between sperm viability and DNA fragmentation rates / M.K. Samplaski, A. Dimitromanolakis, K.C. Lo [et al.] // *Reprod Biol Endocrinol.* – 2015. – V.14. – N.13. – P.42.
441. The results of 154 ICSI cycles using surgically retrieved sperm from azoospermic men / J.D. Nicopoulos, C. Gilling–Smith, P.A. Almeida [et al.] // *Hum Reprod.* – 2004. – N.19(3). –P.579–85.
442. The role of testicular biopsy in the modern management of male infertility / R.A. Schoor, S. Elhanbly, C.S. Niederberger [et al.] // *J Urol.* – 2002. – N.167(1). – P.197–200.
443. The role of varicocele repair in the new era of assisted reproductive technology / M. Cocuzza, M.A. Cocuzza, F.M. Bragais [et al.] // *Clinics.* – 2008. – V. 63. – N. 3. – P.395–404.
444. The Society for Translational Medicine: clinical practice guidelines for sperm DNA fragmentation testing in male infertility / A. Agarwal, C.L. Cho, A. Majzoub [et al.] // *Transl Androl Urol.* – 2017. – N.6(Suppl 4). – P.720–733.
445. The sperm epigenome: implications for the embryo / J.R. Gannon, B.R. Emery, T.G. Jenkins [et al.] // *Adv Exp Med Biol.* – 2014. – N.791. – P.53–66.
446. The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population / F.H. Van der Merwe, T.F. Kruger, S.C. Oehninger [et al.] // *Gynecol Obstet Invest.* – 2005. – N.59. – P.86–91.
447. The Y chromosome–linked copy number variations and male fertility / C. Krausz, C. Chianese, C. Giachini [et al.] // *J Endocrinol Invest.* – 2011. – N.34. – P.376–82.
448. Treatment by testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection of 65 azoospermic patients with non–mosaic Klinefelter syndrome with birth of 17

- healthy children / C. Madureira, M. Cunha, M. Sousa [et al.] // *Andrology*. – 2014. – N.2(4). – P. 623–631.
449. Trends in use of and reproductive outcomes associated with intracytoplasmic sperm injection / S.L. Boulet, A. Mehta, D.M. Kissin [et al.] // *JAMA*. – 2015. – N.313. – P.255–63.
450. Tsujimura A. Microdissection testicular sperm extraction: prediction, outcome, and complications / A. Tsujimura // *Int J Urol*. – 2007. – N.14(10). – P.883–9.
451. Tunc O. Impact of body mass index on seminal oxidative stress / O. Tunc, H.W. Bakos, K. Tremellen // *Andrologia*. – 2011. – N.43. – P.121–8.
452. TUNEL labeling with BrdUTP/anti-BrdUTP greatly underestimates the level of sperm DNA fragmentation in semen evaluation / S.C. Ribeiro, M. Muratori, M. De Geyter [et al.] // *PLoS One*. – 2017. – N.12(8).
453. Unravelling the parental origin and mechanism of formation of the 47, XY, i(1)(q10) Klinefelter karyotype variant / M. Höckner, G.M. Pinggera, B. Günther [et al.] // *Fertil Steril*. – 2008. – N.90(5). – P.2009–2009.
454. Use of ethnicity-specific sequence tag site markers for Y chromosome microdeletion studies / K. Sachdeva, R. Saxena, A. Majumdar [et al.] // *Genet Test Mol Biomarkers*. – 2011. – N.15. – P. 451–459.
455. Use of hyaluronan in the selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection (ICSI): significant improvement in clinical outcomes – multicenter, double-blinded and randomized controlled trial / K.C. Warrilow, S. Eid, D. Woodhouse [et al.] // *Human Reproduction*. – 2013. – V.28. – N2. – P.306–314.
456. Use of surgical sperm retrieval in azoospermic men: a meta-analysis / J.D. Nicopoulos, C. Gilling-Smith, P.A. Almeida [et al.] // *Fertil Steril*. – 2004. – N.82. – P. 691–701.
457. Verza S. Microsurgical versus conventional single – Biopsy testicular sperm extraction in nonobstructive azoospermia: a prospective controlled study / S. Jr. Verza, S.C. Esteves // *Fertil Steril*. – 2011. – N.96(Suppl). – P. 53.

458. Visootsak J. Klinefelter syndrome and other sex chromosomal chromosomal aneuploidies / J. Visootsak, J.M. Jr. Graham // *Orphanet J Rare Dis.* –2006. – N.1. – P.42.
459. Wald M. Therapeutic testis biopsy for sperm retrieval / M. Wald, A.A. Makhlouf, C.S. Niederberger // *Curr Opin Urol.* – 2007. – N.17(6). – P.431–8.
460. Ward W.S. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development / W.S. Ward // *Mol Hum Reprod.* – 2010. – N.16. – P.30–6.
461. What about gr/gr deletions and male infertility? Systematic review and meta-analysis / K. Stouffs, W. Lissens, H. Tournaye [et al.] // *Hum Reprod Update.* – 2011. – N.17(2). – P.197–209.
462. Wosnitzer M.S. Genetic evaluation of male infertility / M.S. Wosnitzer // *Transl Androl Urol.* – 2014. – 3(1). – P.17–26.
463. Wosnitzer M.S. Endocrinological issues and hormonal manipulation in children and men with Klinefelter syndrome / M.S. Wosnitzer, D.A. Paduch // *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* – 2013. – N.163(1). – P.16–26.
464. Y chromosomal microdeletion screening in the workup of male infertility and its current status in India / R. Suganthi, V.V. Vijesh, N. Vandana [et al.] // *IJFS.* – 2014. – N.7. – P.253–266.
465. Y-chromosome AZF regions microdeletions and recurrent pregnancy loss / A. Karaer, K. Karaer, G. Ozaksit [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2008. – N.199(6). – P. 662; e1–5.
466. Y chromosome AZFc microdeletion may not affect the outcomes of ICSI for infertile males with fresh ejaculated sperm / X.H. Liu, J. Qiao, R. Li [et al.] // *J Assist Reprod Genet.* – N.30(6). – P.813–9.
467. Y-chromosome gr/gr deletions area risk factor for low semen quality / L. Visser, G.H. Westerveld, C.M. Korver [et al.] // *Hum Reprod.* – 2009. – N.24(10). – P.2667–73.
468. Y chromosome haplogroups may confer susceptibility to partial AZFc deletions and deletion effect on spermatogenesis impairment / Y. Yang, M. Ma, L. Li [et al.] // *Hum Reprod.* – 2008. – N.23. – P.2167–2172.

469. Y chromosome Microdeletions in Infertile Men with Non-obstructive Azoospermia and Severe Oligozoospermia / S.Y. Kim, H.J. Kim, B.Y. Lee [et al.] //J Reprod Infertil. – 2017. – N.18(3). – P. 307–315.