

Современные подходы к лечению азооспермии методом микро-ТЕСЕ в программе ЭКО/ИКСИ. Обзор литературы. Часть II

К.М.Н. И.И. ВИТЯЗЕВА*, К.М.Н. С.В. БОГОЛЮБОВ, акад. РАН и РАМН И.И. ДЕДОВ

The role of modern technologies in the management of azoospermia using micro-TESE in the framework of the ECF/ICSI program. A literature review. Part II.

I.I. VITYAZEVA, S.V. BOGOLYUBOV, I.I. DEDOV

ФГБУ «Эндокринологический научный центр» (дир. — акад. РАН и РАМН И.И. Дедов) Минздрава РФ, Москва

Во второй части обзора, посвященного лечению азооспермии методом микро-ТЕСЕ в программе ЭКО/ИКСИ, рассматриваются вопросы гормональной подготовки пациентов с необструктивной азооспермией (НОА) препаратами ГнРГ, хорионическим и менопаузальными гонадотропинами. Эффективность извлечения сперматозоидов возрастает после использования стимуляции сперматогенеза в течение 6 мес и более. Оценка дополнительных гормональных факторов, таких как ФСГ, АМГ, ингибин-В в сыворотке и семенной плазме, позволяют более точно прогнозировать исход микро-ТЕСЕ. Высокий уровень ФСГ не является противопоказанием для микрохирургического извлечения сперматозоидов у мужчин с НОА. Ни уровень ФСГ, ни объем яичек не связаны с результативностью операции. Молекулярно-генетические маркеры остаточного сперматогенеза — гены *ESX1*, *VASA*, *CLU* могут служить предикторами успешного извлечения сперматозоидов при микро-ТЕСЕ у пациентов с НОА. Рассмотрены преимущества методики микродиссекции, техника выполнения операции, включая эмбриологический этап выделения сперматозоидов из тестикулярной ткани, результативность микро-ТЕСЕ в зависимости от патоморфологической картины и осложнения после операции.

Ключевые слова: вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ), экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), ИКСИ, обструктивная и необструктивная азооспермия, микро-ТЕСЕ, извлечение сперматозоидов.

In the second part of the review, devoted to treatment of azoospermia by micro-TESE in program IVF/ICSI, there were considered issues of hormonal preparation of patients with non-obstructive azoospermia (NOA) prior to the course of GnRH, chorionic and menopausal gonadotropin treatment. Sperm retrieval efficiency increases after stimulation of spermatogenesis ≥6 months. Identification of additional factors such as FSH, AMH, and Inhibin B in blood serum and seminal plasma can provide more accurate prognosis of the outcome of micro-TESE. High level of FSH is not a contraindication for microsurgical sperm retrieval in men with NOA. Neither level of FSH nor testicular volume is related to the effectiveness of operation. Molecular genetic markers of residual spermatogenesis (*ESX1*, *VASA* and *CLU* genes) can serve as predictors of successful sperm retrieval during micro-TESE in patients with NOA. In the review there were also considered advantages of microdissection technique, technique of operation performance (including embryological stage of detection of spermatozoa in testicular tissue), and efficiency of micro-TESE depending on pathological patterns and complications after surgery.

Key words: assisted reproductive technology (ART), in vitro fertilization (IVF), intracytoplasmic sperm injection (ICSI), obstructive and non-obstructive azoospermia, micro-TESE, sperm retrieval.

1. Гормональное лечение до оперативного вмешательства

Частота выявления случаев идиопатического гипогонадотропного гипогонадизма (ИГГ) и синдрома Кальмана (Kals) у мужчин составляет приблизительно 1:100 000; в основе этих синдромов лежит недостаточность секреции гипоталамического гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ), вследствие чего нарушается гипофизарная секреция гонадотропинов [1].

Протоколы, используемые для лечения гипогонадотропного гипогонадизма, отличаются большой вариабельностью. Например, 2000 МЕ хорионического гонадотропина человека (чХГ) могут назначать до 3 раз в неделю в течение 3–6 мес либо отдельно, либо со 150 МЕ человеческого менопаузального гонадотропина (чМГ), состоящего из равных долей ФСГ и ЛГ. Гонадотропины и ГнРГ стимули-

руют сперматогенез практически одинаково. Пульсирующая ГнРГ-терапия также используется при гипоталамических расстройствах, но ее преимущество перед гонадотропинами весьма спорно; кроме того, она обходится гораздо дороже.

Неопущение яичек (крипторхизм) и малый их объем обычно рассматриваются как отрицательные прогностические факторы для извлечения сперматозоидов. Но даже у пациентов, которые изначально имеют очень маленький объем яичек, успешное лечение возможно. Положительный ответ на проводимую терапию у пациентов с гипогонадотропным гипогонадизмом может быть связан с остаточной функцией гипофиза [2].

D. Buchter и соавт. [3] представили результаты терапии 42 мужчин со вторичным гипогонадизмом. Пациенты с гипоталамическими нарушениями (11 с ИГГ и 10 с Kals) получали ГнРГ (группа Ia) или соче-

тание чХГ/чМГ (группа Ib), а пациенты с гипопитуитаризмом ($n=21$, группа II) — только чХГ/чМГ. В общей сложности было проведено 57 курсов индукции сперматогенеза, и 36 из них — с целью наступления беременности у партнерши. Проводимая терапия в течение 5—12 мес позволила удвоить объем яичек, и в 57 курсах лечения у 54 пациентов удалось восстановить сперматогенез, о чем свидетельствовало появление единичных сперматозоидов в эякуляте. Беременность наступила в 26 из 36 курсов ЭКО/ИКСИ/микро-ТЕСЕ. В лечении данной группы мужчин в целом наблюдалась тенденция к большей продолжительности индукции сперматогенеза, особенно у пациентов с двусторонним крипторхизмом по сравнению с мужчинами с тяжелой патозоспермией и нормальным уровнем гонадотропинов. У мужчин с ИГГ или Kals, леченных препаратами чХГ/чМГ или ГнРГ, не было статистически значимых различий по продолжительности терапии для появления сперматозоидов или наступления беременности. Большое значение для достижения беременности в супружеской паре имел возраст партнерш.

I. Fahmy и соавт. [4] исследовали возможность использования сперматозоидов, полученных при микро-ТЕСЕ, для процедуры ИКСИ у 15 мужчин с азооспермией при гипогонадотропном гипогонадизме после предварительной дооперационной терапии гонадотропинами. Все пациенты получали по 75 МЕ чМГ 3 раза в неделю и 5000 МЕ чХГ 1 или 2 раза в неделю в течение ≥ 6 мес до лечения методом ЭКО/ИКСИ/микро-ТЕСЕ. У 11 (73%) из 15 пациентов были получены сперматозоиды из ткани яичка и использованы для оплодотворения методом ИКСИ; наступили две биохимические беременности, которые не развились в клинические (при УЗИ плодное яйцо не визуализировалось). Продолжили терапию гонадотропинами 9 пациентов в течение последующих 6 мес. Сперматозоиды в эякуляте появились у 3 из них. Остальные 6 пациентов прошли повторный цикл ЭКО/ИКСИ, 1 мужчина отказался от повторной операции микро-ТЕСЕ (для оплодотворения были использованы криоконсервированные сперматозоиды), и 5 мужчин прошли повторную операцию микро-ТЕСЕ для получения свежих сперматозоидов. В результате наступила одна биохимическая и три клинические маточные беременности, из которых одна беременность на тот период времени пролонгировалась, и родились 3 здоровых доношенных детей.

В общей сложности, из 17 циклов ИКСИ сперматозоидами, полученными с помощью микро-ТЕСЕ, оплодотворение было достигнуто в 41,7% случаев, а суммарная частота беременности составила 20%.

Сохранение малых размеров яичек и азооспермии свидетельствовало об отсутствии ответа на гормональную терапию у пациентов. Отрицательный результат, по мнению авторов [5], был связан как с

изначально маленьким объемом яичек, так и со зрелым возрастом пациентов. ФСГ, благодаря его действию на клетки Сертоли и гематотестикулярный барьер, играет важную роль в регуляции микроваскулярности яичек. Преждевременные повторные прерывания циклов гормональной терапии могут привести к фиброзным изменениям яичка, что, в конечном счете, снижает эффект гормональной терапии. В этом исследовании все пациенты получали гормональную терапию периодически, что замедляло реакцию после отмены лечения. Необходимо отметить, что при гистопатологическом исследовании тканей яичек 3 пациентов отмечалась обширная гиалинизация семенных канальцев. Частота оплодотворения (41,7%) и частота наступления беременности в цикле ИКСИ (17,6%) оказались значительно ниже, чем в случаях обструктивной азооспермии (ОА) — 57,9 и 34,5% соответственно, и очень сходными с данными, полученными у пациентов с необструктивной азооспермией (НОА) — 41,2 и 16,6% соответственно.

C. Akarsu и соавт. [6] провели лечение гонадотропинами 10 мужчин с гипогонадотропным гипогонадизмом, олигоспермией или азооспермией секреторного типа. Терапия перед микрохирургическим извлечением сперматозоидов — (микро-ТЕСЕ) для оплодотворения в программе ЭКО/ИКСИ продолжалась не менее 10 мес. Сперматозоиды были получены и заморожены у всех мужчин. В 6 циклах ЭКО/ИКСИ были использованы свежеполученные сперматозоиды, в 4 циклах — размороженные. В циклах, в которых использовались размороженные сперматозоиды, не наступило ни одной беременности, тогда как в циклах с использованием свежих сперматозоидов были получены 3 клинические беременности, из которых 2 успешно завершились рождением 3 здоровых детей.

Таким образом, в большинстве исследований подчеркивается необходимость длительного лечения гипогонадотропного гипогонадизма для предоперационной подготовки. По мнению авторов, мужчинам с азооспермией при гипогонадотропном гипогонадизме можно предложить терапию гонадотропинами в течение 6 мес и более, так как такая терапия улучшает результаты ЭКО/ИКСИ/микро-ТЕСЕ.

У пациентов с гипогонадотропным гипогонадизмом, проходящих гормональное лечение, сперматозоиды появляются в семенных канальцах яичка задолго до их появления в эякуляте. Таким пациентам должен быть предложен метод ЭКО/ИКСИ/микро-ТЕСЕ для скорейшего наступления беременности.

2. Эндокринные факторы прогноза результативности микро-ТЕСЕ

Выявление дополнительных факторов, которые позволили бы более точно прогнозировать исход

ТЕСЕ, и тем самым отбирать пациентов с наилучшей перспективой этой процедуры, имеет большое значение.

R. Ramasamy и соавт. [7] выполнили операцию микро-ТЕСЕ с последующей процедурой ИКСИ у 792 мужчин с НОА. Мужчины были разделены на четыре группы в зависимости от уровня сывороточного ФСГ: <15, 15–30, 31–45 и >45 МЕ/мл. Сперматозоиды из ткани яичка были успешно извлечены у 60% мужчин. Частота извлечения сперматозоидов в группах мужчин с уровнем ФСГ 15–30, 31–45 и >45 МЕ/мл составила 60, 67 и 60% соответственно, что было выше, чем в группе мужчин с уровнем ФСГ <15 МЕ/мл (51%). От тех мужчин, от которых были получены сперматозоиды, наступление клинических беременностей и частота живорожденных детей были одинаковыми в четырех группах (46, 50, 52, 46 и 38, 45, 44, 36% соответственно). Частота получения сперматозоидов при микро-ТЕСЕ, пригодных для дальнейшего использования, у мужчин с повышенным уровнем ФСГ была такой же, как и у мужчин с более низким его уровнем. Результаты микро-ТЕСЕ отличались от полученных этими авторами ранее, когда вероятность извлечения сперматозоидов при обычной биопсии у мужчин с повышенным уровнем ФСГ была очень низкой. По мнению авторов [7, 8], высокий уровень ФСГ не является противопоказанием для микрохирургического извлечения сперматозоидов у мужчин с НОА. Другие исследователи [9, 10] также не отмечали связи между объемом яичек и уровнем ФСГ с результативностью микро-ТЕСЕ.

T. Mostafa и соавт. [11] определяли уровни антимюллерова гормона (АМГ) в семенной плазме у фертильных и бесплодных мужчин. Было проанализировано 84 случая. Пациенты были разделены на четыре группы: с нормозооспермией (НС) ($n=16$), с олигоастенотератозооспермией (ОАТ) ($n=15$), с азооспермией: ОА ($n=13$) и НОА ($n=40$).

Группа пациентов с НОА была разделена на две подгруппы: с неудачными ($n=19$) и успешными результатами по частоте извлечения сперматозоидов (sperm retrieval rate — SRR) ($n=21$). Средний уровень АМГ в семенной плазме был значительно выше в группе у фертильных мужчин, чем у пациентов с ОАТ ($41,5 \pm 10,9$ пмоль/л против $30,5 \pm 10,3$ пмоль/л, $p<0,05$). АМГ не был обнаружен ни у одного из пациентов с ОА. Уровень АМГ положительно коррелировал с объемом яичка ($r=0,329$; $p=0,005$), количеством сперматозоидов ($r=0,483$; $p=0,007$), процентом подвижности сперматозоидов ($r=0,419$; $p=0,021$); и отрицательно — с процентом морфологически ненормальных сперматозоидов ($r=-0,413$; $p=0,023$). Незначительная корреляция имела с возрастом мужчин ($r=-0,155$; $p=0,414$) и уровнем ФСГ в плазме ($r=-0,014$; $p=0,943$). У пациентов с НОА АМГ в семенной плазме был обнаружен в 23

из 40 случаев, 14 (57,5%) из них были с успешными микро-ТЕСЕ; в 17 (58,2%) из 40 случаев АМГ обнаружен не был, 10 из них были с неудачными микро-ТЕСЕ. M. Taumouг и соавт. [12] также не выявили АМГ в семенной плазме пациентов с ОА в 100% случаев. Однако, по мнению авторов, уровень АМГ в семенной плазме является плохим предиктором успешности извлечения сперматозоидов у пациентов с НОА.

Ингибин секретируется клетками Сертоли и участвует в регуляции секреции гипофизарного ФСГ; наибольшую роль у мужчин играет его изоформа В. У мужчин, страдающих бесплодием, уровень ингибина-В коррелирует с уровнем ФСГ в сыворотке, количеством сперматозоидов в эякуляте и объемом яичек. Однако ни ингибин-В, ни ФСГ, ни их сочетание в сыворотке не позволяют точно предсказать наличие сперматозоидов в биоптатах яичек. Таким образом, роль уровня ингибина-В в сыворотке в качестве предиктора присутствия в яичках сперматозоидов остается недоказанной.

J. Ballesca и соавт. [13] изучали информативность уровня ингибина-В в отношении успешного извлечения сперматозоидов при микро-ТЕСЕ. Операцию выполняли у бесплодных пациентов с НОА ($n=17$), у мужчин контрольных групп с ОА ($n=22$) и доноров спермы с НС ($n=29$). При НОА уровни ФСГ были выше ($p<0,01$), а ингибина-В — значительно ниже ($p<0,001$), чем в контрольных группах. У тех пациентов, у которых удалось извлечь сперматозоиды, концентрация в сыворотке крови ингибина-В была значительно выше, чем в случаях безуспешной операции, но различия в уровнях ФСГ и объеме яичек между этими группами отсутствовали. Именно уровень ингибина-В >40 пг/мл (чувствительность 90%, специфичность 100%), а не ФСГ определял различия между успешными и неуспешными ТЕСЕ. Поэтому авторами был сделан вывод, что по уровню ингибина-В в сыворотке можно судить о сперматогенезе. При сопоставлении уровня ингибина-В в сыворотке с гистологией биоптатов тестикулярной ткани S. von Eckardstein и соавт. [14] нашли, что у мужчин с нормальным сперматогенезом ($n=9$) уровень ингибина-В составляет 238 ± 32 пг/мл; у пациентов с остановкой развития зародышевых клеток сперматогенеза ($n=15$) — 102 ± 18 пг/мл; у пациентов с гипосперматогенезом ($n=23$) — 98 ± 16 пг/мл; при очаговом Сертоли-клеточном синдроме (СКС) ($n=26$) — 41 ± 6 пг/мл и при полном СКС ($n=18$) — 27 ± 8 пг/мл. Процент канальцев при СКС, а также число канальцев с удлинненными сперматидами коррелировал с уровнем ингибина-В больше ($r=-0,58$; $p<0,01$), чем с ФСГ ($r=0,34$; $p<0,05$). Однако, по мнению авторов, ни ФСГ, ни ингибин-В по отдельности не могут точно предопределять тип повреждения сперматогенеза.

L. Tunc и соавт. [15] также оценивали роль уровня ФСГ, ингибина-В и объема яичек в качестве

предикторов успешности извлечения сперматозоидов (SRR) при ТЕСЕ в соответствии с гистологическим диагнозом у 52 мужчин с НОА. Операция была успешной у 31 (59,6%) пациента. Уровень ингибина-В 6,25 пг/мл лучше разграничивал успешные и неудачные микро-ТЕСЕ, чем другие показатели (чувствительность 90%), но его специфичность (14%) и диагностическая точность (53,8%) были очень низкими. О наличии сперматозоидов лучше свидетельствовало сочетание двух параметров, но и это не являлось абсолютно надежным: операция микро-ТЕСЕ могла быть успешной даже в тех случаях, когда уровни обоих гормонов находились за пределами пороговых значений.

Y. Nagata и соавт. [16] оценивали прогностическую значимость уровня ингибина-В в семенной плазме, который непосредственно отражает секрецию клеток Сертоли, в отношении успешности получения сперматозоидов при ТЕСЕ у мужчин с НОА. Уровень ингибина-В измеряли иммуноферментным методом. Сперматозоиды из ткани яичка были получены у 17 (27,4%) из 62 пациентов. Уровни ФСГ в сыворотке были значительно ниже, а концентрации ингибина-В в сыворотке и семенной плазме — значительно выше, чем у пациентов, у которых получить сперматозоиды не удалось. В соответствии с анализом ROC-кривой, наилучший пороговый уровень ингибина-В в семенной плазме составлял 27,0 пг/мл (чувствительность 88,2%, специфичность 93,3%); тогда как пороговый уровень ингибина-В в сыворотке (34,0 пг/мл) обладал меньшей чувствительностью (70,6%) при специфичности 95,6%. Площадь под ROC-кривой для уровня ингибина-В в семенной плазме была значительно больше, чем для уровня ФСГ в сыворотке и объема яичек. Мультивариантный анализ логистической регрессии показал, что только уровень ингибина-В в семенной плазме является независимым предиктором наличия сперматозоидов в ткани яичек при НОА.

E. Duvilla и соавт. [17] провели предварительное проспективное исследование прогностической ценности уровней ингибина-В и АМГ в семенной плазме в отношении получения сперматозоидов из яичка при микро-ТЕСЕ у 68 пациентов с НОА и в контрольных группах (47 мужчин с НС и 28 с олигоспермией). Уровни ингибина-В и АМГ в семенной плазме значительно различались между этими группами. Средние уровни АМГ в семенной плазме зависели от этиологии азооспермии. Количество извлеченных сперматозоидов значимо коррелировало с уровнями ингибина-В (но не АМГ) в семенной плазме. Также выявлена корреляция между уровнями ингибина-В в семенной плазме и сыворотке.

A. Tsujimura и соавт. [18] в ретроспективном исследовании 100 больных с НОА с помощью многофакторного логистического моделирования проанализировали 9 предоперационных факторов,

включая возраст пациентов, объем яичек и эндокринологические данные. Сперматозоиды были успешно получены у 41 (41%) пациента. Авторы нашли, что наибольшей информативностью из предоперационных факторов обладают концентрации ФСГ, общего тестостерона (ТТ) и ингибина-В, и предложили формулу для расчета вероятности успешного исхода микродиссекции:

$$P = [1 + \exp(5,201 - 0,048 \times \text{ФСГ} - 0,449 \times \text{ТТ} - 0,021 \times \text{ингибин-В})](-1).$$

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

Таким образом, по мнению авторов, прогностическое значение каждого параметра в отношении успеха микро-ТЕСЕ достаточно низка. Необходимо исследовать как можно большее число параметров как в сыворотке, так и в семенной плазме.

3. Молекулярно-генетические маркеры остаточного сперматогенеза — предикторы успешного получения сперматозоидов при микро-ТЕСЕ у пациентов с НОА

ТЕСЕ с последующей процедурой ИКСИ в последние годы считается первой линией лечения бесплодных пациентов с НОА. Несмотря на новые модификации ТЕСЕ [19], SRR при этой операции остается низкой (примерно 40—60%). На сегодняшний день не выявлено ни одного достоверного предиктора успешного SRR для мужчин с НОА. Идентификация новых молекулярно-генетических маркеров остаточного сперматогенеза, позволяющих прогнозировать получение сперматозоидов при обычной ТЕСЕ или микро-ТЕСЕ у пациентов с НОА, представляется крайне перспективным направлением исследований.

Пациенты с различными формами азооспермии имеют генетические особенности гамет. L. Rodrigo и соавт. [20], проводя цитогенетическое исследование хромосом 13, 18, 21, X и Y в 7 образцах тестикулярных сперматозоидов (метод флуоресцентной гибридизации *in situ*, FISH) у мужчин с ОА и в 13 образцах пациентов с НОА, выявили повышение частоты хромосомных aberrаций, особенно при НОА. Отмечено повышение дисомии половых хромосом — 29% ($p < 0,01$) у пациентов с ОА; у мужчин с НОА чаще выявлялась диплоидия — в 54% ($p < 0,0001$) и дисомия 13 ($p < 0,0001$), 21 ($p < 0,001$) и половых хромосом ($p < 0,0001$) по сравнению с контрольной группой. В тестикулярных сперматозоидах пациентов с азооспермией чаще обнаруживаются хромосомные аномалии (в основном половых хромосом), особенно у пациентов с НОА.

Молекулярно-генетическим маркером является гомеобоксодержащий ген *ESX1*, локализованный в X-хромосоме и экспрессирующийся в яичках, плаценте, мозге и легких человека. Его экспрессия специфична для пре- и постмейотических зароды-

шевых клеток семенников мышей. Е. Bonaparte и соавт. [21] проводили анализ гена *ESX1* в биопсийном материале ткани яичка у 81 мужчины с различными нарушениями сперматогенеза при НОА и с интактным сперматогенезом при ОА. Экспрессия гена наблюдалась в 62 (95,4%) из 65 образцов с интактным сперматогенезом (при ОА) и его нарушениями от неполного СКС до полной остановки сперматогенеза. Напротив, транскрипция *ESX1* была выявлена лишь в незначительном количестве случаев полного СКС — 3 (18,7%) из 16 пациентов. Полученные данные указывают на наличие выраженной корреляции между экспрессией *ESX1* и сохранностью какого либо этапа сперматогенеза; мРНК *ESX1* обнаруживалась во всех случаях присутствия зародышевых клеток во всех семенных канальцах или в ограниченных фокусах вне зависимости от стадии остановки развития.

М. Ando и соавт. [22] выясняли, можно ли использовать присутствие мРНК некоторых молекулярных маркеров сперматогенеза в качестве предикторов успешного получения сперматозоидов при микро-TECE у пациентов с НОА. У 52 пациентов с НОА методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени исследовали экспрессию генов *VASA*, *ODF1*, *ODF2* и *SMCP* в митохондриях сперматозоидов, полученных из ткани яичка.

Ген *VASA* кодирует семейство DEAD-белков АТФ-зависимой РНК-геликазы; он содержится в эмбриональных и зрелых половых клетках обоих полов и играет ключевую роль в развитии зародыша. Ген *ODF* кодирует 2 типа белков — *ODF1* и *ODF2*, входящих в структуры цитоскелета хвоста сперматозоидов и влияющих на их подвижность и морфологию. *SMCP* является структурным белком, богатым цистеином и пролином, который связан с кератиновой капсулой оболочки митохондрий и с окружающей внешней плотной оболочкой аксономы жгутика сперматозоида [23, 24].

Не было выявлено существенных различий в возрасте пациентов, объеме яичек, уровнях ФСГ, ЛГ и тестостерона между группами успешной и неуспешной ТЕСЕ, однако доля пациентов с СКС в успешной группе ТЕСЕ была значительно ниже, чем в неуспешной. Экспрессия мРНК генов *VASA*, *ODF1*, *ODF2*, и *SMCP* в успешной группе была значительно выше, чем в неуспешной. Как показал гистологический анализ, значимым предиктором получения сперматозоидов при микро-ТЕСЕ может быть только мРНК *VASA*. Эти данные позволяют предположить, что измерение уровня мРНК *VASA* в яичках является полезным дополнением к обычным параметрам прогноза получения сперматозоидов при микро-ТЕСЕ у пациентов с НОА. Необходимо подчеркнуть, однако, что размер выборки из 52 пациентов для такой распространенной патологии, как НОА, недостаточен для надежного вывода. По-

скольку при экспрессии гена *VASA* вероятность успешного извлечение сперматозоидов при микро-ТЕСЕ была значительно выше, чем в случаях отсутствия его экспрессии, авторы считают этот тест абсолютно необходимым и рекомендуют проводить его у гораздо большего числа пациентов с НОА.

А. Zalata и соавт. [25] оценивали акросомальную активность сперматозоидов, фрагментацию ДНК и экспрессию гена *CLU* у 124 мужчин с НС, астенотератозооспермией и олигоастенотератозооспермией. У человека ген *CLU* кодирует кластерин — гетеродимерный белок, участвующий в ряде процессов, включая апоптоз, регуляцию опосредованного комплементом лизиса клеток, рециклирование мембран и др. Этот белок имеет несколько названий: димерный кислый гликопротеин, репрессируемый тестостероном маркер простаты-2, сульфатированный гликопротеин-2 и ингибитор лизиса, опосредованного комплементом. Кластерин был обнаружен в семенной жидкости в 1988 г. У человека ген *GLU* локализован на хромосоме 8 (8p21). Этот ген весьма консервативен (70—80% гомологии у разных видов млекопитающих). Кластерин содержится в большинстве тканей и биологических жидкостей млекопитающих. Авторы анализировали экспрессию гена *CLU* в семенниках у фертильных и бесплодных мужчин. Уровни мРНК *CLU* и кластерина в образцах спермы бесплодных пациентов с ОАТ, астенотератозооспермией и астенотератозооспермией были значительно выше, чем у здоровых фертильных мужчин. Экспрессия гена *CLU* отрицательно коррелировала с количеством сперматозоидов, их подвижностью, индексом акросомальной активности, линейным индексом и линейной скоростью, а также положительно коррелировала с процентом сперматозоидов аномальной формы и фрагментацией ДНК.

Таким образом, в настоящее время ведется активный поиск генетических предикторов обнаружения остаточного сперматогенеза в ткани яичка, так как ни один из известных на сегодня маркеров, за исключением делеций в субрегионах *AZF*a и *AZF*b, не является абсолютно надежным прогностическим фактором.

4. Преимущества методики микро-ТЕСЕ

Выявление расширенных участков семенных канальцев, нередко единичных, с сохраненным сперматогенезом — основная задача ТЕСЕ; дополнительное оптическое увеличение позволяет отличать более крупные беловатые и прозрачные канальцы с активным сперматогенезом от тех, где продукция сперматозоидов отсутствует. Такой подход сопряжен с удалением меньшего количества тестикулярной ткани, что крайне важно при имеющейся гипоплазии яичек. Кроме того, идентификация бессосудистых участков при разрезе белочной оболоч-

ки практически сводит к минимуму вероятность повреждения сосудов.

P. Schlegel [19] сравнил две группы пациентов: 22 мужчинам проводилась стандартная множественная биопсия, 27 — микро-TECE. Автор наблюдал значительное повышение SRR при проведении последней (63% против 45%), но в данной работе не были представлены результаты гистологического исследования биоптатов. У пациентов, подвергшихся микро-TECE, удалялось значительно меньшее количество тестикулярной ткани (9,4 мг против 720,0 мг). К 2006 г. группа P. Schlegel провела 684 микро-TECE у 563 мужчин; SRR при этом составляла 61% [26].

В ретроспективном исследовании H. Okada и соавт. [27] сравнивали результаты обычной TECE (24 случая) и микро-TECE (76). При микро-TECE имела место значительно более высокая SRR, чем при обычной TECE (44,6% против 16,7%). Кроме того, только микро-TECE позволяла получать сперматозоиды у пациентов с синдромом Клайнфельтера. При дополнительном анализе выяснилось, что микро-TECE обеспечивала достоверно большую SRR только при СКК (33,9% против 6,3%; $p=0,04$), но не при остановке сперматогенеза (МА) (75% против 37,5%; $p=0,2$). Возможное объяснение этих различий заключается в том, что в случаях МА, несмотря на присутствие очагов активного сперматогенеза, все каналы однообразны, тогда как при СКК различный внешний вид канальцев позволяет идентифицировать участки сперматогенеза.

В сравнительном исследовании M. Amer и соавт. [28], включавшем 116 мужчин, была показана значительно большая SRR при TECE с дополнительной микроскопией, чем при обычной TECE (47% против 30%). Однако высокий успех операции наблюдался только при той или иной степени гипосперматогенеза. Недостаток этого исследования заключался в том, что, поскольку биопсия производилась с диагностической целью, в группе обычной TECE был получен только один биоптат, тогда как в микрохирургической группе — два.

Более крупное исследование R. Ramasamy и соавт. [8], включавшее 435 мужчин (83 — обычная TECE и 460 — микро-TECE), обнаружило существенно большую SRR только в случаях гипосперматогенеза (81% против 50%), но не в случаях СКК или остановки развития зародышевых клеток. Однако несбалансированность двух групп пациентов в этом исследовании не позволяет сделать надежный вывод [8].

SRR при микро-TECE зависит не только от патоморфологической картины ткани яичек, но и от их объема. В ретроспективном исследовании J. Mulhall и соавт. [29] показали, что только при объеме яичек ниже 10 мл SRR при микро-TECE выше, чем при обычной TECE (42% против 27%). Обе группы были сравнимы по возрасту и гистологической картине яичек. Дополнительное преимуще-

ство микро-TECE заключалось в меньшей необходимости двусторонней биопсии (42% против 82%) и меньшем числе разрезов белочной оболочки яичка ($1,4 \pm 0,4$ против $3,2 \pm 1,2$).

В отличие от этих авторов, A. Tsujimura и соавт. [30] сообщили о сравнимых результатах обычной TECE и микро-TECE (SRR 35,1 и 42,9% соответственно; $p>0,05$). Пациенты обеих групп имели одинаковый возраст, эндокринный профиль, гистологическую картину и объем тестикул. При микро-TECE время операции было значительно больше (146,8 мин против 68,2 мин). Сперматозоиды были получены во всех случаях гомогенного утолщения семенных канальцев и только у 17 (65,4%) из 26 пациентов с гетерогенными канальцами.

K. Okubo и соавт. [31] на первом этапе у пациентов с НОА проводили обычную TECE. Если сперматозоиды были получены, то дальнейшее вмешательство прекращали. Микро-TECE проводили только тем пациентам, у которых обычная TECE оказалась неудачной. Сперматозоиды были успешно извлечены при обычной TECE у 4 (24%) из 17 пациентов с НОА. Остальные 13 пациентов подверглись микро-диссекции, и сперматозоиды были успешно извлечены у еще 4 из них. Применение метода микро-TECE привело к улучшению SRR с 24 до 48%. Ни у одного из пациентов не было отмечено осложнений. ИКСИ было выполнено у 5 из 8 пациентов с успешным SRR, и у 4 пар наступила маточная беременность, завершившаяся рождением здоровых детей. Эти результаты указывают на целесообразность применения микро-TECE для увеличения вероятности получения сперматозоидов у мужчин с НОА и совпадают с мнением других авторов [32].

A. Tsujimura и соавт. [33] также выявили сравнимую частоту SRR у пациентов, подвергшихся как первичной, так и микро-TECE, проведенной после безуспешной обычной TECE (45,7% против 44,0%). Необходимо отметить, что в данном исследовании 30% пациентов проводили только одностороннюю обычную TECE и только у 9 из них была проведена множественная биопсия. Тем не менее методика микро-TECE оказалась успешной у 3 из 9 пациентов, у которых ранее проведенная двусторонняя TECE с множественными биопсиями не увенчалась успехом.

R. Ramasamy и P. Schlegel [34] сообщили об отсутствии порога для ранее произведенных отрицательных биопсий перед микродиссекцией, хотя отметили, что у пациентов, подвергавшихся ранее 3—4 биопсиям, SRR была значительно ниже, чем у тех, кому производили 1—2 биопсии (23% против 51%).

5. Техника выполнения операции.

Эмбриологический этап выделения сперматозоидов из тестикулярной ткани

Процедура прямого микроскопического выявления и извлечения функционирующих (расширен-

ных) семенных канальцев (микродиссекция, микро-ТЕСЕ) впервые была осуществлена P. Schlegel в 1999 г. [19]. Как и при стандартной мультифокальной биопсии, использовалось оптическое увеличение ($\times 6$ — 8) для визуализации кровеносных сосудов под поверхностью влажной оболочки, что позволяло производить разрезы в аваскулярных зонах яичка. При микрохирургической биопсии вместо нескольких разрезов проводилось широкое рассечение белочной оболочки вблизи срединной части яичка для оптимальной визуализации его паренхимы с минимальным нарушением кровоснабжения. Дальнейшее прямое изучение паренхимы яичка осуществлялось под операционным микроскопом при 20—25-кратном увеличении. Во время этой процедуры идентифицировали отдельные непрозрачные белесые и более крупные по диаметру семенные канальцы. Проводился забор образцов ткани из паренхимы яичка весом всего 2—10 мг, что было значительно меньше, по сравнению со стандартной биопсией, при которой, в зависимости от объема яичка, извлекалось 250—750 мг ткани.

Микрохирургическая биопсия прекращалась, когда сперматозоиды были получены, а дальнейшее вмешательство могло нарушить кровоснабжение яичка. Из каждого биоптата выделяли небольшие участки семенных канальцев для оценки эффективности обоих методов. Каждый образец ткани нарезают на более мелкие кусочки, что позволяло освободить сперматозоиды из семенных канальцев. Затем извлеченную ткань суспензировали и несколько раз аспирировали катетером 24G (Angiocath). Небольшие аликваты исследовали под фазово-контрастным микроскопом при 200-кратном увеличении. Данный метод повышал возможность извлечения сперматозоидов у мужчин с НОА.

M. Ostad и соавт. [35] исследовали каждый извлеченный образец тестикулярной ткани путем помещения микрокапли суспензии в камеру для подсчета клеточных элементов (Cell-Vu, Cat. No. DR600; Erie Scientific Co., Erie, PA, США) и определяли в нем наличие и количество сперматозоидов. Если сперматозоиды в исходном образце не были обнаружены, то брали следующие образцы из ипсилатерального, а затем и из контралатерального яичка до тех пор, пока не находили сперматозоиды или принимали решение, что дальнейшее вмешательство может привести к ухудшению кровоснабжения яичка. Если нормальные канальцы не обнаруживались, то извлекали любые другие канальцы, которые отличались только размерами. Если все канальцы имели идентичную структуру, то выполнялась не микро-ТЕСЕ, а стандартная биопсия. Все хирургические процедуры проводились последовательно одним и тем же хирургом. В образцах, полученных с помощью микро-ТЕСЕ и стандартной биопсии, сравнивали количество полученных сперматозои-

дов и объем извлеченной ткани. После микро-ТЕСЕ лучшие образцы тестикулярной ткани инкубировали в течение ночи в среде для отмывки сперматозоидов при 37 °С. Каждый образец анализировался опытным эмбриологом. На следующий день проводили пункцию фолликулов у партнерши. Оплодотворение ооцитов осуществляли методом ИКСИ.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о статистически значимых различиях в количестве полученных сперматозоидов и объеме извлеченной ткани в пользу микро-ТЕСЕ по сравнению со стандартной биопсией [27, 35, 36].

R. Ramasamy и соавт. [37] оценивали время проведения микродиссекции как в успешных, так и в неудачных микрохирургических процедурах. В общей сложности были проанализированы 793 операции микро-ТЕСЕ у мужчин с НОА, которые прошли первую попытку с января 2000 по сентябрь 2009 г. Все операции выполнял один уролог. Из клинических факторов учитывали возраст пациента, наличие варикоцеле, объем яичек. Гормональная оценка включала определение уровня ФСГ в течение предшествующих 2 мес. О гистологии яичка судили по результатам предыдущих биопсий, сделанных в другом месте, или по данным интраоперационной экспресс-биопсии. Анализ кариотипа был проведен у всех пациентов. Диагноз азооспермии у всех пациентов был подтвержден не менее чем 2-кратным семиологическим анализом в соответствии с рекомендациями ВОЗ от 1999 г. Оперативное время рассчитывалось с момента разреза до момента прекращения процедуры.

Сперматозоиды были успешно получены у 57% пациентов и обнаруживались в пределах до 2 (1-я группа), 2—4 (2-я группа) и 4—7 ч (3-я группа) в 89, 30 и 37% случаев соответственно. Не существовало различий между группами пациентов в таких предоперационных клинических характеристиках пациентов, как возраст, уровень ФСГ, объем яичек, частота синдрома Клайнфельтера и распространение наиболее частых вариантов гистопатологии. У партнерш тех мужчин 1, 2 и 3-й групп, у которых были получены сперматозоиды, клиническая беременность наступила в 48, 45 и 29% случаев; живые дети родились в 37, 30 и 29% случаев соответственно ($p > 0,05$). Анализ ROC-кривой времени оперативного вмешательства для обнаружения сперматозоидов показал, что оптимальное время составляет 125 мин (AUC 0,81; чувствительность 84% и специфичность 95%).

Вероятность извлечения сперматозоидов при микро-ТЕСЕ была наибольшей в течение первых 2 ч операции (89%). Для 213 (47%) успешных процедур, которые привели к наступлению клинической беременности, среднее время операции составило 1,8 ч (0,5—6,6 ч), а для безуспешных попыток обнаружения сперматозоидов — 2,7 ч (0,8—7,5 ч). Однако у 37% мужчин сперматозоиды удавалось обнаружить

при микро-ТЕСЕ продолжительностью более 4 ч. Ретроспективный анализ данных не выявил конкретного времени, после которого извлечение сперматозоидов оказывалось невозможным.

6. Результативность микро-ТЕСЕ и факторы прогноза получения сперматозоидов в зависимости от гистологии яичек

По данным I. Ghalayini и соавт. [38], микро-ТЕСЕ, проведенная у 65 пациентов, оказывалась более чем в 2 раза результативнее открытой биопсии (68 пациентов); при этом была выявлена связь между частотой обнаружения сперматозоидов, объемом яичек, уровнем ФСГ и ЛГ и гистологическими данными. Уровни тестостерона или пролактина не влияли на успешность обнаружения сперматозоидов. SRR при микро-ТЕСЕ была значительно выше, чем при обычной ТЕСЕ (56,9 и 38,2% соответственно) и положительно коррелировала с объемом яичка, отрицательно — с уровнем ФСГ. У пациентов с гипосперматогенезом при обычной ТЕСЕ сперматозоиды были извлечены в 84%, а при микро-ТЕСЕ — в 92,9% случаев ($p=0,3$). В случае остановки развития зародышевого эпителия SRR составляла 27,3 и 36,4% соответственно ($p=0,6$), а при СКС — 6,2 и 26,9% соответственно ($p=0,03$). Серьезные послеоперационные осложнения отсутствовали у пациентов всех групп, и ни одному из пациентов не потребовалась послеоперационная гормональная терапия гипогонадизма. Авторы рекомендуют проводить микро-ТЕСЕ при гипотрофии яичек и при СКС с высоким уровнем ФСГ.

Для индукции беременности в исходе ЭКО/ИКСИ и микро-ТЕСЕ важно использовать свежеполученные (в день или накануне получения ооцитов), а не замороженные/оттаянные сперматозоиды. Так, J. Schiff и соавт. [39] не получили ни одной беременности при применении размороженных тестикулярных сперматозоидов у пациентов с синдромом Клайнфельтера.

Ранее S. Friedler и соавт. [40] провели ряд исследований, в которых использовали и те, и другие сперматозоиды от мужчин 23—36 лет с немозаичной формой синдрома Клайнфельтера. Исходные уровни ФСГ были повышены, составляя в среднем $38,3 \pm 11,4$ мМЕ/мл (22—58 мМЕ/мл). Объем яичек колебался от 2 до 4 мл. Зрелые сперматозоиды были найдены при микро-ТЕСЕ у 5 (42%) из 12 пациентов. Часть ткани яичка замораживали. Не было найдено статистически значимых различий в частоте оплодотворения (FR) (66,0% против 58,0%), частоте деления эмбрионов (CR) (98,0% против 90,0%) и частоте имплантации (IR) (33,3% против 21,4%) при использовании свежих и криоконсервированных сперматозоидов. Использование свежих сперматозоидов обусловило 2 одноплодные беременности и одну беременность тройней. После использования замо-

роженных/оттаянных сперматозоидов были получены 2 беременности (в 1 случае родилась двойня и в 1 имел место ранний самопроизвольный выкидыш). Все рожденные дети были генетически здоровыми.

Определение только параметра SRR, по мнению J. Nicoroullis и соавт. [41], недостаточно для оценки эффективности циклов ЭКО/ИКСИ с использованием тестикулярных сперматозоидов от мужчин с НОА. Согласно метаанализу 154 циклов ИКСИ с использованием сперматозоидов, полученных хирургическим путем у мужчин с азооспермией, при НОА показатели FR и IR были значительно ниже, чем после оплодотворения эякуляторными сперматозоидами ($p<0,05$), но различия в частоте клинических беременностей (PR) в этих группах не достигали статистической значимости ($p=0,08$). Криоконсервация эпидимальных сперматозоидов не влияла на эффективность программы ЭКО/ИКСИ, а использование замороженных тестикулярных сперматозоидов приводило к снижению FR, существенно не влияя на IR и PR. Эмбрионы, полученные после оплодотворения тестикулярными сперматозоидами мужчин с НОА, чаще имели морфологические нарушения после 2 дней дробления.

Известны лишь немногие исследования, в которых изучалось влияние метода получения сперматозоидов на вероятность конечного успеха. R. Mercan и соавт. [42] на основании результатов 291 цикла ИКСИ с использованием сперматозоидов пациентов с НОА нашли, что тестикулярные сперматозоиды, полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии (FNA), обуславливают более высокую частоту имплантации и беременности, чем полученные при ТЕСЕ, поскольку FNA проводится при нарушении сперматогенеза в меньшей степени. Путем FNA зрелые сперматозоиды были получены у 53,6% мужчин, путем открытой ТЕСЕ — у 71,8%. IR и PR при обычной ТЕСЕ составляли 13,3 и 28,9% соответственно, а при FNA — 20,7 и 46,0%. Частота родов на перенос эмбриона (DR/ET) и число новорожденных не указаны. Гистологический диагноз был установлен только у 50 из 63 пациентов группы FNA и у 129 из 228 пациентов группы ТЕСЕ.

A. Khadra и соавт. [43] получили при FNA зрелые сперматозоиды в 53,6%, при обычной ТЕСЕ 3 в 71,8% случаев, но при FNA отмечали большую частоту оплодотворения, чем при ТЕСЕ. Однако не было найдено статистически значимой разницы в частоте наступления беременностей: 39,1% при ТЕСЕ и 49,8% при FNA. Небольшое количество пациентов и неполная гистологическая картина не позволяют сделать окончательный вывод об эффективности той или иной методики.

M. Karacan и соавт. [44] провели анализ 337 циклов ЭКО/ИКСИ с подвижными тестикулярными сперматозоидами, полученными с помощью микро-ТЕСЕ у пациентов с азооспермией. В 166 циклах

(группа А) сперматозоиды извлекали в день получения ооцитов, в 42 циклах (группа В) — за день до получения ооцитов. В 129 циклах (группа С) использовали замороженные/оттаянные сперматозоиды. Группы были сопоставимы по возрасту мужчин и женщин, ответу яичников на стимуляцию, а также числу зрелых ооцитов для оплодотворения. Пациенты с НОА и ОА равномерно распределялись в каждой группе. В группах А, В и С FR составила 70,7, 68,7 и 67,3%; PR — 31,3, 30,9 и 25,5%, а частота родов (DR) — 28,9, 28,5 и 23,2% соответственно. По мнению авторов, ни этиология азооспермии, ни время проведения микро-ТЕСЕ (в день или за день до получения ооцитов) не влияют на исход лечения. Исходы при использовании сперматозоидов пациентов с НОА и ОА не различались ни внутри, ни между группами. К сожалению, в работе не приведены данные о гистологической картине яичек у пациентов с НОА и не указана длительность и причины ОА.

S. Esteves и соавт. [45] сравнили результаты использования сперматозоидов 370 мужчин с азооспермией (НОА и ОА) и 465 бесплодных мужчин с тяжелой формой патозооспермии (для ИКСИ использовали эякуляторные сперматозоиды). Кроме того, был проведен обзор 20 публикаций, касающихся беременностей и детей, родившихся после ИКСИ с использованием сперматозоидов мужчин с ОА и НОА. Частота живорождений в группе НОА была значительно ниже (21,4%), чем в группе ОА (37,5%) и патозооспермии (32,3%). Не наблюдались различий между группами в сроках гестации при преждевременных родах и массой тела детей при рождении, хотя имелась тенденция к низким неонатальным исходам в группах азооспермии. Общая перинатальная смертность и частота пороков развития в разных группах были практически одинаковыми.

U. Gul и соавт. [46] ретроспективно оценили документы 134 пациентов с СКС, которым ранее была проведена ТЕСЕ. Существенные различия между пациентами, у которых удалось (27,6%, 1-я группа) и не удалось (72,4%, 2-я группа) извлечь сперматозоиды, в возрасте, продолжительности бесплодия, объеме яичек, уровнях ФСГ, ЛГ и тестостерона в сыворотке отсутствовали. ИКСИ была выполнена у 36 пациентов. FR, IR и PR составляли для 1-й группы 60,86±23,03, 36,53±41,78 и 51,3% соответственно; частота живорождений на цикл и на пациента — 37,8 и 45,1% соответственно. SRR для пациентов с СКС была значительно ниже, чем для пациентов с другими формами НОА. Авторы не выявили параметров для прогнозирования удачного извлечения сперматозоидов у пациентов с СКС.

В литературе мы не нашли рандомизированных или наблюдательных исследований, в которых сравнивалась бы частота живорождений и клинических беременностей при использовании сперматозоидов, полученных с помощью микро-ТЕСЕ и обычной ТЕСЕ.

7. Осложнения микро-ТЕСЕ

Целью применения менее инвазивных методов, таких как FNA и микро-ТЕСЕ, является снижение частоты осложнений после манипуляции. Повреждение яичек при инвазивных вмешательствах может быть обусловлено либо нарушением кровоснабжения семявыносящих канальцев, либо повышением внутритестикулярного давления вследствие кровоизлияния под практически нерастяжимую белочную оболочку [47].

Первые УЗИ, проведенные P. Schlegel и соавт. [48] через 3 мес после обычной ТЕСЕ с одной или множественными биопсиями, обнаруживали внутритестикулярную гематому почти у 80% пациентов. В проспективном исследовании M. Amer и соавт. [28] участвовали 100 мужчин с идентичной гистологией обоих яичек. На одном яичке выполняли обычную ТЕСЕ, на другом — микро-ТЕСЕ. SRR при микродиссекции была значительно выше, чем при обычной ТЕСЕ (47,0 и 30,0% соответственно; $p<0,05$). В дальнейшем наблюдали 60 пациентов, проводя УЗИ через 1, 3 и 6 мес после операции. Острые и хронические осложнения в виде очаговых гипоехогенных участков, указывающих на гематому, на стороне микрохирургического вмешательства встречались значительно реже, чем на стороне обычной ТЕСЕ ($p<0,05$), где участки деваскуляризации были обнаружены в 7, а после микро-ТЕСЕ — в 2 яичках. Однако через 6 мес зоны деваскуляризации не выявлялись ни у одного пациента. Таким образом, осложнения при микро-ТЕСЕ возможны, но этот метод безопаснее обычной ТЕСЕ и значительно повышает SRR у больных с НОА. H. Okada и соавт. [27] также с большей частотой обнаруживали гипоехогенные зоны через 1 мес после обычной ТЕСЕ, чем после микро-ТЕСЕ (51% против 12%).

В ретроспективном исследовании R. Ramasamy [8] участвовали 435 мужчин с НОА, перенесших 543 операции. Первые 83 операции были проведены обычным методом открытой ТЕСЕ, а остальные — микро-ТЕСЕ. SRR составил 32 и 57% соответственно ($p=0,0002$). УЗИ показали, что через 3—6 мес у пациентов группы микро-ТЕСЕ имелось меньшее число острых (гематомы, воспаление) и хронических (гиалиноз, склероз) изменений, чем в группе обычной ТЕСЕ ($p<0,05$). За этот период уровень тестостерона снизился на 20% от исходного в обеих группах ($p<0,01$); через 12 мес, опять-таки в обеих группах, он составлял 85% от исходного, а через 18 мес — 95% от исходного. Существенная разница в темпах нормализации уровня тестостерона после операций между группами отсутствовала. Снижение уровня тестостерона после обычной ТЕСЕ больше средней величины было отмечено у 12 мужчин, перенесших две или более биопсии. Средний уровень ФСГ в обеих группах увеличился с 22 ± 2 до 30 ± 3 МЕ/л ($p=0,02$), а ЛГ — с 12 ± 2 до 16 ± 2 МЕ/л ($p=0,2$). Степень изменения

уровня ЛГ коррелировала со степенью снижения уровня тестостерона после операции.

Таким образом, оба инвазивных вмешательства сказывались на функции яичек, но микро-ТЕСЕ является более безопасной операцией, чем обычный метод и существенно улучшает поиск и извлечение сперматозоидов у пациентов с НОА.

В ранних работах при УЗИ, проводимых после ТЕСЕ, выявлялись гиперэхогенные очаги (фиброз, кальцификация) паренхимы яичка, свидетельствующие о формировании рубцовой ткани. Так, P. Schlegel и соавт. [48] при 6-месячном наблюдении за пациентами, перенесшими ТЕСЕ, находили такие изменения в 9 из 14 случаев.

P. Donoso и соавт. [32] отмечают, что сравнения послеоперационных осложнений FNA и ТЕСЕ проводились лишь в немногих исследованиях. Например, T. Harrington и соавт. [49] в 10 (29%) случаях из 34 открытых ТЕСЕ и в 4 (7%) из 58 FNA выявили признаки интратестикулярного кровотечения или новую область повышенной эхогенности через 1 мес после процедуры. Все интрапаренхиматозные рубцы сохранялись до 6 мес после операции. S. Friedler и соавт. [50] документировали 1 случай кровоизлияния после FNA и 2 случая после обычной ТЕСЕ. С другой стороны, A. Khadra и соавт. [43] в группе из 84 мужчин вообще не наблюдали геморрагических осложнений ни после FNA, ни после ТЕСЕ.

R. Ron-El и соавт. [51] проводили УЗИ и цветное доплеровское сканирование у 14 пациентов с НОА и 6 — с ОА непосредственно перед операцией, на 5-й день, через 2 нед, а также через 2 и 6 мес после нее. Объемы оперированных яичек в обеих группах оставались неизменными в течение всего периода наблюдения. В группе НОА фокусное поражение яичка на 5-й день после процедуры отмечалось в 77% случаев, а через 6 мес — в 54% случаев. В группе ОА очаговые поражения в ткани яичка не визуализировались. Экстратестикулярные гематомы были выявлены в 4 случаях НОА (исчезли через 6 мес) и не обнаруживались ни у одного пациента с ОА. M. Amer и соавт. [28] через 6 мес после обычной ТЕСЕ обнаружили фиброз в 30,0% случаев, а после микро-ТЕСЕ — только в 3,3%. Аналогичные результаты были получены H. Okada и соавт. [27], которые выявили очаговые изменения эхогенности у 23% пациентов после обычной ТЕСЕ и отсутствие таких изменений в группе микро-ТЕСЕ.

Некоторые авторы [52, 53] относят мужчин с НОА после ТЕСЕ к группе высокого риска по развитию андрогенной недостаточности и гипогонадизма, так как у многих таких пациентов уровень тестостерона значительно ниже, а уровень ЛГ и E_2 значительно выше, чем у фертильных мужчин. Снижение функции клеток Лейдига после биопсии яичек может еще больше уменьшать содержание тестостерона в сыворотке, угрожая такими тяжелыми

последствиями, как остеопороз, инсулинорезистентность и депрессия.

Удаление меньшего количества тестикулярной ткани при микро-ТЕСЕ (по сравнению с обычной ТЕСЕ), по всей видимости, может уменьшать риск таких осложнений. После обычной ТЕСЕ, по данным H. Okada и соавт. [27], уменьшение объема яичек до <2 мл обнаруживалось чаще, чем после микро-ТЕСЕ. При длительном наблюдении за 64 пациентами после ТЕСЕ P. Schlegel и соавт. [48] было выявлено 2 случая односторонней атрофии яичка, подтвержденной результатами цветного доплеровского сканирования.

Значительное снижение уровня тестостерона обнаруживалось и после микро-ТЕСЕ. K. Everaert и соавт. [54] определяли уровни тестостерона у пациентов с НОА после микро-ТЕСЕ в течение $2,4 \pm 1,1$ года. За этот период гипогонадизм впервые был установлен у 5 (16%) из 31 пациента. У остальных мужчин отмечалось также значимое снижение уровня тестостерона в сыворотке. Авторы считают обязательным мониторинг уровня тестостерона в отдаленные сроки после микрохирургической биопсии у пациентов с НОА.

Исследования A. Oliveira Filho и соавт. [55] на кроликах показали, что в течение 45 дней после микрохирургической биопсии яичка уровни ЛГ, ФСГ и тестостерона в сыворотке не менялись. Не было выявлено также существенных изменений в морфометрических показателях семенных канальцев оперированных яичек. Однако отмечалась остановка развития герминального эпителия в контрлатеральном яичке. Авторы связывают этот эффект с повреждением внутрияичковых сосудов, выраженной воспалительной реакцией и активацией антиспермального иммунитета и призывают к более тщательному наблюдению за пациентами в послеоперационном периоде.

8. Заключение

Азооспермия, являющаяся наиболее тяжелой формой патозооспермии, выявляется у 1% всего мужского населения и у 10–15% бесплодных мужчин и подразделяется на ОА и НОА. Последняя встречается чаще (почти в 60,0% случаев); возможно также сочетание НОА и ОА. Нарушение проходимости семявыносящих протоков (ОА) может быть обусловлено травмой, урогенитальными инфекциями, операциями на органах мошонки, вазорезекцией с целью мужской контрацепции, а также некоторыми генетическими синдромами, например муковисцидозом. НОА диагностируется при нарушении созревания или отсутствия сперматозоидов в ткани яичка, т.е. при тестикулярной недостаточности, причинами которой могут быть генетические нарушения (аномалии половых хромосом, транслокации и мутации в AZF-зоне Y-хромосомы), крипторхизм,

перекрут яичка, воздействие репротоксикантов — радиоактивного облучения, химиотерапии и отравления токсинами.

Несмотря на отсутствие сперматозоидов в эякуляте при НОА, у некоторых мужчин с этой патологией можно получить сперматозоиды из ткани яичек, поскольку в ней могут сохраняться отдельные мелкие очаги активного сперматогенеза. Теоретической основой попыток получения сперматозоидов для ИКСИ из яичек мужчин с очевидным отсутствием сперматогенеза явились гистологические исследования тестикулярных биоптатов как у фертильных, так и у бесплодных мужчин. Существует, по-видимому, некий минимальный порог сперматогенеза, при котором сперматозоиды могут попадать в эякулят. Множественная мультифокальная биопсия при ТЕСЕ должна увеличивать SRR. Однако удаление большого объема тестикулярной ткани в некоторых случаях приводит к окончательному нарушению функции и атрофии яичек. Поэтому оптимальный метод получения достаточного числа подвижных сперматозоидов для ИКСИ и/или криоконсервации (для последующих попыток) должен быть минимально травматичным.

В последнее десятилетие для выбора регионов с более интенсивным кровоснабжением, где в ряде случаев выявляется более активный сперматогенез, стали применять цветное доплеровское сканирование. Это позволяет получать сперматозоиды при ТЕСЕ у 77% мужчин с НОА; даже при значительно повышенном уровне ФСГ сперматозоиды обнаруживаются практически в 50% случаев. Обнаружение зрелых сперматозоидов при НОА является ключевым этапом успешного лечения бесплодного брака. Еще более важным является наступление беременности и рождение здоровых детей.

Отрицательное психоэмоциональное влияние безуспешной процедуры по обнаружению сперматозоидов в яичках мужчин с НОА заставило многих исследователей еще до операции искать факторы, ассоциированные с вероятностью обнаружения сперматозоидов, такие как возраст пациента при орхиопексии по поводу крипторхизма, орхо(эпидим)ит в анамнезе, синдром Клайнфельтера, суммарный объем яичек (гипогонадизм), микроделеции в AZF-зоне Y-хромосомы, а также отсутствие сперматозоидов при диагностической биопсии яичек.

Микроделеции факторов азооспермии на длинном плече Y-хромосомы — наиболее часто встречающиеся генетические изменения при азооспермии и тяжелой форме олигозооспермии. При НОА такие микроделеции выявляются у 15—25% мужчин, при тяжелой патозооспермии — у 7—10%. Наиболее часто микроделеции обнаруживаются в субрегионе AZFc (до 72%), в субрегионе AZFb (15—16%), в субрегионе AZFa (5—6%). Абсолютное отрицательное прогностическое значение имеют только делеции

всего комплекса AZFa,b,c, означающие полное отсутствие сперматогенеза. Таким образом, предварительное (до операции) определение делеций в AZF-регионах Y-хромосомы позволяет прогнозировать результативность биопсии яичка. Без преимплантационной генетической диагностики использование сперматозоидов с делециями в AZF-регионе Y-хромосомы может приводить к передаче этой патологии потомству мужского пола.

Синдром Клайнфельтера — наиболее частая форма мужского гипергонадотропного гипогонадизма. Этот синдром диагностируется у 10—12% мужчин с азооспермией. Распространенность синдрома Клайнфельтера колеблется от 1/500 до 1/1000 в общей популяции мужского населения и возрастает до 3—4% среди бесплодных мужчин. Спектр фенотипов взрослых пациентов с СК очень широк и колеблется от явного гипогонадизма до нормально вирилизованных мужчин. Из-за отсутствия явных симптомов заболевания, только у 10% пациентов диагноз устанавливается в препубертатном периоде.

Ранее мужчин с синдромом Клайнфельтера мозаичной формы (47,XXY) считали абсолютно бесплодными. При гистологическом исследовании ткани яичек у них определяются обширные поля клеток Лейдига и гиалинизированные и склерозированные семенные каналы с редкими очагами незаконченного сперматогенеза. С появлением современных вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) и методов ИКСИ и микро-ТЕСЕ появилась возможность лечения бесплодия у этой группы пациентов.

Несмотря на небольшой объем яичек у мужчин с синдромом Клайнфельтера, микро-ТЕСЕ позволяет извлечь сперматозоиды в 42,0—72,2% случаев. Мужчины с гипергонадотропным гипогонадизмом, которые реагируют на гормональную терапию, имеют больше шансов на благоприятный исход лечения бесплодия. Объем яичек, уровень тестостерона и результаты теста с ЧХГ являются важными прогностическими факторами у данной группы пациентов. У пациентов, участвующих в программе микро-ТЕСЕ/ИКСИ, повышается уровень самооценки, что благоприятно влияет на психологический комфорт в супружеской паре.

Согласно современным рекомендациям, НОА диагностируется только на основании гистологического анализа, поскольку клинические и эндокринные параметры не всегда позволяют точно разграничить ОА и НОА. Это очень важно, поскольку без гистологического анализа сперматозоиды можно обнаружить практически во всех случаях ОА и только в 50% случаев НОА. Следует отметить необходимость единой морфометрической оценки биоптатов ткани яичка, которую можно было бы использовать при сравнении результатов разных исследований. Предложенная

R. McLachlan и соавт. [56] новая классификация: 1) нормальный тестикулярный биоптат, 2) гипосперматогенез, 3) остановка развития зародышевых клеток, 4) СКС, 5) гиалинизация семенных канальцев, 6) карцинома *in situ*, 7) незрелые яички обеспечивает такую возможность, но создает определенные трудности при интерпретации ранее полученных данных.

В большинстве случаев ИГГ (как первичного, так и вторичного) и Kals, в основе которых лежит недостаточность гипоталамического ГнРГ, гормональное лечение дает положительный эффект. Продолжительность индукции сперматогенеза у данной группы мужчин составляет 6—12, а в некоторых случаях и 15 мес, особенно у пациентов с двусторонним крипторхизмом в анамнезе. У мужчин с ИГГ и Kals продолжительность терапии препаратами чГХ/чМГ или ГнРГ до появления сперматозоидов или наступления беременности статистически не различается; PR составляет 20%. Отсутствие увеличения размеров яичек и сохранение азооспермии указывает на безуспешность гормональной терапии. Последнее может быть связано с изначально маленьким объемом яичек и зрелым возрастом пациентов.

Таким образом, большинство исследований подчеркивают необходимость длительного лечения гипогонадотропного гипогонадизма в течение 6 мес и более в качестве предоперационной подготовки, что в дальнейшем улучшает результаты ЭКО/ИКСИ/микро-ТЕСЕ.

Идентификация дополнительных факторов, которые позволяли бы более точно прогнозировать исход ТЕСЕ, имеет большое значение. Высокий уровень ФСГ не является противопоказанием для микрохирургического извлечения сперматозоидов у мужчин с НОА. Ни уровень ФСГ, ни объем яичек не связаны с результативностью микро-ТЕСЕ.

АМГ в семенной плазме отсутствует во всех случаях ОА. Однако по этому показателю нельзя точно предсказать успех извлечения сперматозоидов у пациентов с НОА.

Концентрация ингибина-В, секретируемого клетками Сертоли, коррелирует с уровнем ФСГ в сыворотке, количеством сперматозоидов в эякуляте и объемом яичек. Однако ни ингибин-В, ни ФСГ, ни их сочетание в сыворотке не позволяют точно предсказать наличие сперматозоидов в биоптатах яичек и не определяют тип повреждения сперматогенеза. Роль уровня ингибина-В в сыворотке в качестве предиктора присутствия сперматозоидов в яичках остается недоказанной, хотя ряд авторов считают этот уровень полезным показателем. Действительно, многомерный регрессионный анализ обнаружил, что только уровень ингибина-В в семенной плазме является независимым предиктором наличия сперматозоидов в ткани яичек у мужчин с НОА.

Вероятность успешного извлечения сперматозоидов возрастает при учете как можно большего

количества клинических данных — объема яичек, уровней ФСГ, ЛГ, тестостерона, АМГ, ингибина-В, гистологического диагноза (по результатам предварительной биопсии), и результатов генетических исследований (кариотип, микроделеции AZF-зоны Y-хромосомы), но и этого бывает недостаточно. Поиск новых молекулярно-генетических маркеров остаточного сперматогенеза представляется крайне перспективным направлением исследований. Установлено, что мРНК *ESX1* обнаруживается во всех случаях присутствия зародышевых клеток во всех семенных канальцах или в ограниченных фокусах независимо от стадии остановки развития сперматогенеза. Полезным дополнением к обычным параметрам прогноза является и экспрессия гена *VASA* в яичках.

Современные рекомендации по методикам хирургического получения сперматозоидов основаны на результатах только наблюдательных исследований, что не позволяет сделать окончательные выводы. Кроме того, в большинстве исследований отсутствовали адекватные контрольные группы и применялись разные критерии включения пациентов. Однако ТЕСЕ с множественной биопсией обеспечивает более высокую SRR, чем FNA, особенно в случаях СКС и остановки сперматогенеза. Микро-ТЕСЕ обладает преимуществом перед обычной ТЕСЕ, повышая SRR. Микро-ТЕСЕ рекомендуется при гипотрофии яичек (особенно при их объеме менее 10,0 см³), при высоком уровне ФСГ в крови, а также в случаях предполагаемого или доказанного (по результатам гистологических исследований предыдущих биопсий) СКС, при котором можно обнаружить канальцы с активными очагами сперматогенеза. При микро-ТЕСЕ уменьшается количество извлекаемой ткани, необходимой для получения сперматозоидов, меньше нарушается архитектура канальцев, чем при FNA, снижается риск осложнений, таких как фиброз и гипогонадизм, но микро-ТЕСЕ более трудоемка, требует технического обеспечения, оперативных навыков специалиста, занимает большее время, чем FNA.

Влияние микро-ТЕСЕ на частоту беременностей и живорождения изучалось лишь в немногих исследованиях. Возможно, что данные о лучших результатах, полученных с помощью FNA или обычной ТЕСЕ, чем при микро-ТЕСЕ, объясняются погрешностью в отборе пациентов или тем, что первые подходы использовались в более легких случаях нарушения сперматогенеза. В литературе мы не нашли публикаций, в которых сравнивалась бы частота живорождений и клинических беременностей при использовании сперматозоидов, полученных с помощью микро-ТЕСЕ и обычной ТЕСЕ.

Так или иначе, но у пациентов с НОА, ранее считавшихся совершенно неперспективными в плане репродукции, появилась реальная возможность стать

родителями. Дальнейшее повышение эффективности программ ЭКО/ИКСИ/микро-ТЕСЕ предполагает дополнительную оценку роли неинвазивных методов (таких, как доплерография) в идентификации очагов, в которых с наибольшей вероятностью можно обнаружить сперматозоиды, а также поиск адекватных молекулярно-генетических предикторов успешного извлечения сперматозоидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андрология. Мужское здоровье и дисфункция репродуктивной системы. Под ред. Э. Нишлага, Г.М. Бере. М: МИА 2005; 185—187.
2. European Metrodin HP Study Group. Efficacy and safety of highly purified urinary follicle-stimulating hormone with human chorionic gonadotropin for treating men with isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril* 1998; 70: 2: 256—262.
3. *Büchter D., Behre H.M., Kliesch S., Nieschlag E.* Pulsatile GnRH or human chorionic gonadotropin/human menopausal gonadotropin as effective treatment for men with hypogonadotropic hypogonadism: a review of 42 cases. *Eur J Endocrinol* 1998; 139: 3: 298—303.
4. *Fahmy I., Kamal A., Shamloul R., Mansour R., Serour G., Aboulghar M.* ICSI using testicular sperm in male hypogonadotropic hypogonadism unresponsive to gonadotrophin therapy. *Hum Reprod* 2004; 19: 7: 1558—1561.
5. *Fahmy I., Mansour R., Aboulghar M., Serour G., Kamal A., Tawab N.A., Ramzy A.M., Amin Y.* Intracytoplasmic sperm injection using surgically retrieved epididymal and testicular spermatozoa in cases of obstructive and non-obstructive azoospermia. *Int J Androl* 1997; 20: 1: 37—44.
6. *Akarsu C., Caglar G., Vicdan K., Isik A.Z., Tuncay G.* Pregnancies achieved by testicular sperm recovery in male hypogonadotropic hypogonadism with persistent azoospermia. *Reprod Biomed Online* 2009; 18: 4: 455—459.
7. *Ramasamy R., Lin K., Gosden L.V., Rosenwaks Z., Palermo G.D., Schlegel P.N.* High serum FSH levels in men with nonobstructive azoospermia does not affect success of microdissection testicular sperm extraction. *Fertil Steril* 2009; 92: 2: 590—593.
8. *Ramasamy R., Yagan N., Schlegel P.N.* Structural and functional changes to the testis after conventional versus microdissection testicular sperm extraction. *Urology* 2005; 65: 1190—1194.
9. *Tsujimura A.* Microdissection testicular sperm extraction: prediction, outcome, and complications. *Int J Urol* 2007; 14: 10: 883—889.
10. *Hibi H., Ohori T., Yamada Y., Honda N., Asada Y.* Probability of sperm recovery in nonobstructive azoospermic patients presenting with testes volume less than 10 ml/FSH level exceeding 20 mIU/ml. *Arch Androl* 2005; 51: 3: 225—231.
11. *Mostafa T., Abdel-Malak G., Nsser T.A., Zohdy W., Ashour S., El-Gayar D., Awad H.H.* Seminal plasma anti-Müllerian hormone level correlates with semen parameters but does not predict success of testicular sperm extraction (TESE). *Asian J Androl* 2007; 9: 2: 265—270.
12. *Taymour M., Medhat K.A., Guirgis A.M., Taha A.N., Wael Z., Shedeed A., Dina E.G., Hosam H.A.* Seminal plasma anti-Müllerian hormone level correlates with semen parameters but does not predict success of testicular sperm extraction (TESE). *Asian J Androl* 2007; 265—270.
13. *Ballesca J.L., Balasch J., Calafell J.M., Alvarez R., Fabregues F., de Osaba M.J., Ascaso C., Vanrell J.A.* Serum inhibin B determination is predictive of successful testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2000; 15: 8: 1734—1738.
14. *Von Eckardstein S., Simoni M., Bergmann M., Weinbauer G.F., Gassner P., Schepers A.G., Nieschlag E.* Serum inhibin B in combination with serum follicle-stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples. *J Clin Endocrinol Metabol* 1999; 84: 7: 2496—2501.
15. *Tunc L., Kirac M., Gurocak S., Yucel A., Kupeli B., Alkibay T., Bozkirli I.* Can serum Inhibin B and FSH levels, testicular histology and volume predict the outcome of testicular sperm extraction in patients with non-obstructive azoospermia? *Int Urol Nephrol* 2006; 38: 3—4: 629—635.
16. *Nagata Y., Fujita K., Banzai J., Kojima Y., Kasima K., Suzuki M., Tanaka K.* Seminal plasma inhibin-B level is a useful predictor of the success of conventional testicular sperm extraction in patients with non-obstructive azoospermia. *J Obstet Gynaecol Res* 2005; 31: 5: 384—388.
17. *Duvilla E., Lejeune H., Trombert-Paviot B., Gentil-Perret A., Tostain J., Levy R.* Significance of inhibin B and anti-Müllerian hormone in seminal plasma: a preliminary study. *Fertil Steril* 2008; 89: 2: 444—448.
18. *Tsujimura A., Matsumiya K., Miyagawa Y., Takao T., Fujita K., Koga M., Takeyama M., Fujioka H., Okuyama A.* Prediction of successful outcome of microdissection testicular sperm extraction in men with idiopathic nonobstructive azoospermia. *J Urol* 2004; 172: 5: Pt 1: 1944—1947.
19. *Schlegel P.N.* Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod* 1999; 14: 1: 131—135.
20. *Rodrigo L., Rubio C., Mateu E., Simon C., Remohi J., Pellicer A., Gil-Salom M.* Analysis of chromosomal abnormalities in testicular and epididymal spermatozoa from azoospermic ICSI patients by fluorescence in situ hybridization. *Hum Reprod* 2004; 19: 1: 118—123.
21. *Bonaparte E., Moretti M., Colpi G.M., Nerva F., Contalbi G., Vaccalluzzo L., Tabano S., Grati F.R., Gazzano G., Sirchia S.M., Simoni G., Gallina A., Miozzo M.* ESX1 gene expression as a robust marker of residual spermatogenesis in azoospermic men. *Hum Reprod* 2010; 25: 6: 1398—1403.
22. *Ando M., Yamaguchi K., Chiba K., Miyake H., Fujisawa M.* Expression of VASA mRNA in testis as a significant predictor of sperm recovery by microdissection testicular sperm extraction in patient with nonobstructive azoospermia. *J Androl* 2012; 33: 4: 711—716.
23. *Castrillon D.H., Quade B.J., Wang T.Y., Quigley C., Crum C.P.* The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. 2000; 97: 17: 9585—9590.
24. *Nayemia K., Adham I.M., Burkhardt-Gottges E., Neesen J., Rieche M., Wolf S., Sancken U., Kleene K., Engel W.* Asthenozoospermia in mice with targeted deletion of the sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein (Smcp) gene. 2002; 22: 9: 3046—3052.
25. *Zalata A., El-Samanoudy A.Z., Shaalan D., El-Baiomy Y., Taymour M., Mostafa T.* Seminal clusterin gene expression associated with

- seminal variables in fertile and infertile men. *J Urol* 2012; 188: 4: 1260—1264.
26. Schlegel P.N., Tanrikut A., Li P.S. Microdissection testicular sperm extraction (TESE) in non-obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2006; 86: S519.
 27. Okada H., Dobashi M., Yamazaki T., Haza I., Fujisawa M., Arakawa S., Kamidono S. Conventional versus microdissection testicular sperm extraction for non obstructive azoospermia. *J Urol* 2002; 168: 1063—1067.
 28. Amer M., Ateyah A., Hany R., Zohdy W. Prospective comparative study between microsurgical and conventional sperm extraction in non-obstructive azoospermia: follow-up by serial ultrasound examinations. *Hum Reprod* 2000; 15: 653—656.
 29. Mulhall J.P., Ghaly S.W., Ahmed A. The utility of optical loupe magnification for testis sperm extraction in men with nonobstructive azoospermia. *J Androl* 2005; 26: 178—181.
 30. Tsujimura A., Matsumiya K., Miyagawa Y., Tohda A., Miyura H., Nishimura K., Koga M., Takeyama M., Fujioka H., Okuyama A. Conventional multiple or microdissection testicular sperm extraction: a comparative study. *Hum Reprod* 2002; 17: 2924—2929.
 31. Okubo K., Ogura K., Ichioka K., Terada N., Matsuta Y., Yoshimura K., Arai Y., Honda T., Umeoka K., Nakahori T., Takahashi A., Umaoka Y. Testicular sperm extraction for nonobstructive azoospermia: results with conventional and microsurgical techniques. *Hinyokika Kyo* 2002; 48: 275—280.
 32. Donoso P., Toumaye H., Devroey P. Which is the best sperm retrieval technique for nonobstructive azoospermia? A systematic review. *Hum Reprod Update* 2007; 13: 6: 539—549.
 33. Tsujimura A., Miyagawa Y., Takao T., Takada S., Koga M., Takeyama M., Matsumiya K., Fujioka H., Okuyama A. Salvage microdissection testicular sperm extraction after failed conventional testicular sperm extraction in patients with nonobstructive azoospermia. *J Urol* 2006; 175: 1446—1449.
 34. Ramasamy R., Schlegel P.N. Microdissection testicular sperm extraction: effect of prior biopsy on success of sperm retrieval. *J Urol* 2007; 177: 1447—1449.
 35. Ostad M., Liotta D., Ye Z., Schlegel P.N. Testicular sperm extraction for nonobstructive azoospermia: results of a multibiopsy approach with optimized tissue dispersion. *Urology* 1998; 52: 692—696.
 36. Schlegel P.N., Palermo G.D., Goldstein M., Menendez S., Zaninovic N., Veeck L.L., Rosenwaks Z. Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for nonobstructive azoospermia. *Urology* 1997; 49: 435—440.
 37. Ramasamy R., Fisher E.S., Ricci J.A., Leung R.A., Schlegel P.N. Duration of Microdissection Testicular Sperm Extraction Procedures: Relationship to Sperm Retrieval Success. *J Urol* 2011; 185: 4: 1394—1397.
 38. Ghalayini I.F., Al-Ghazo M.A., Hani O.B., Al-Azab R., Bani-Hani I., Zayed F., Haddad Y. Clinical comparison of conventional testicular sperm extraction and microdissection techniques for non-obstructive azoospermia. *J Clin Med Res*
 39. Schiff J.D., Palermo G.D., Veeck L.L., Goldstein M., Rosenwaks Z., Schlegel P.N. Success of testicular sperm extraction [corrected] and intracytoplasmic sperm injection in men with Klinefelter syndrome. *J Clin Endocrinol Metabol* 2005; 90: 11: 6263—6267.
 40. Friedler S., Raziel A., Strassburger D., Schachter M., Bern O., Ron-El R. Outcome of ICSI using fresh and cryopreserved-thawed testicular spermatozoa in patients with non-mosaic Klinefelter's syndrome. *Hum Reprod* 2001; 16: 2616—2620.
 41. Nicopoulos J.D., Gilling-Smith C., Almeida P.A., Ramsay J.W. The results of 154 ICSI cycles using surgically retrieved sperm from azoospermic men. *Hum Reprod* 2004; 19: 3: 579—585.
 42. Mercan R., Urman B., Alatas C., Aksoy S., Nuhoglu A., Isiklar A., Balban. Outcome of testicular sperm retrieval procedures in non-obstructive azoospermia: percutaneous aspiration versus open biopsy. *Hum Reprod* 2000; 15: 1548—1551.
 43. Khadra A., Abdulhadi I., Ghunain S., Kilani Z. Efficiency of percutaneous sperm aspiration as a mode of sperm collection for intracytoplasmic sperm injection in nonobstructive azoospermia. *J Urol* 2003; 169: 603—605.
 44. Karacan M., Alwaely F., Erkan S., Cebi Z., Berberoglugil M., Batukan M., Ulug M., Arvas A., Camhbel T. Outcome of intracytoplasmic sperm injection cycles with fresh testicular spermatozoa obtained on the day of or the day before oocyte collection and with cryopreserved testicular sperm in patients with azoospermia. *Fertil Steril* 2013; pii: S0015—0282(13)00731-0. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.06.031.
 45. Esteves S.C., Agarwal A. Reproductive outcomes, including neonatal data, following sperm injection in men with obstructive and nonobstructive azoospermia: case series and systematic review. *Clinics (Sao Paulo)* 2013; 68: Suppl 1: 141—150.
 46. Gul U., Turunc T., Haydardedeoglu B., Yaycioglu O., Kuzgunbay B., Ozkardes H. Sperm retrieval and live birth rates in presumed Sertoli-cell-only syndrome in testis biopsy: a single centre experience. *Andrology* 2013; 1: 1: 47—51. doi: 10.1111/j.2047-2927.2012.00003.x.
 47. Silber S.J. Microsurgical TESE and the distribution of spermatogenesis in nonobstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2000; 15: 2278—2284.
 48. Schlegel P.N., Su L.M. Physiological consequences of testicular sperm extraction. *Hum Reprod* 1997; 12: 8: 1688—1692.
 49. Harrington T.G., Schauer D., Gilbert B.R. Percutaneous testis biopsy: an alternative to open testicular biopsy in the evaluation of the subfertile man. *J Urol* 1996; 156: 5: 1647—1651.
 50. Friedler S., Raziel A., Strassburger D., Soffer Y., Komarovsky D., Ron-El R. Testicular sperm retrieval by percutaneous fine needle sperm aspiration compared with testicular sperm extraction by open biopsy in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1997; 12: 7: 1488—1493.
 51. Ron-El R., Strauss S., Friedler S., Strassburger D., Komarovsky D., Raziel A. Serial sonography and colour flow Doppler imaging following testicular and epididymal sperm extraction. *Hum Reprod* 1998; 13: 12: 3390—3393.
 52. Schill T., Bals-Pratsch M., Kuoker W., Sandmann J., Johannisson R., Diedrich K. Clinical and endocrine follow-up of patients after testicular sperm extraction. *Fertil Steril* 2003; 9: 281—286.
 53. Andersson A.M., Jorgensen N., Frydelund Larsen L., Rajpert-De Meyts E., Skakkebaek N.E. Impaired Leydig cell function in infertile men: A study of 357 idiopathic infertile men and 318 proven fertile controls. *J Clin Endocrinol Metabol* 2004; 89: 3161—3167.
 54. Everaert K., De Croo I., Kerckhert W., Dekuyper P., Dhont M., Van Der Elst J., De Sutter P., Comhaire F., Mahmoud A., Lumen N. Long-term effects of micro-surgical testicular sperm extraction on androgen status on patients with non obstructive azoospermia. *BMC Urology* 2006; 6: 9.
 55. Oliveira Filho A.B., Souza R.S., Azeredo-Oliveira M.T., Peruquetti R.L., Cedenho A.P. Microdissection testicular sperm extraction causes spermatogenic alterations in the contralateral testis. *Genet Mol Res* 2010; 9: 3: 1405—1413.
 56. McLachlan R.I., Rajpert-De Meyts E., Hoesi-Hansen C.E. et al. Histological evaluation of the human testis—approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review. *Hum Reprod* 2007; 22: 2—16.