

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра цитології, гістології та
репродуктивної медицини

Зав. кафедри
проф. Микола ДЗЕРЖИНСЬКИЙ
Протокол №____ засідання кафедри
від “____” _____ 2023 р.

**АНАЛІЗ БЛАСТУЛЯЦІЇ ЕМБРІОНІВ І ЧАСТОТИ НАСТАННЯ
ВАГІТНОСТІ ПРИ ЗАПЛІДНЕННІ СПЕРМАТОЗОЇДАМИ,
ОТРИМАНИХ МЕТОДОМ ЕКСТРАКЦІЇ ЯЄЧОК TESE**

Випускна кваліфікаційна робота
магістра
денної форми навчання
за спеціальністю 091 Біологія
Артеменко Марини Олегівни
Науковий керівник від кафедри
канд. біол. наук, доц. Пазюк Л.М.

Робота виконана у клініці IVMED
під керівництвом керівника ембріологічної лабораторії Павла Мазура

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

AZF	-	azoospermia factor (фактор азооспермії)
FNA	-	fine needle aspiration - аспірація тонкою голкою
FSH	-	follicle-stimulating hormone (фолікулостимулюючий гормон)
ICSI	-	intracytoplasmic sperm injection (інтрацитоплазматична ін'єкція сперматозоїдів)
KS	-	Klinefelter syndrome (синдром Клайнфельтера)
LH	-	luteinizing hormone (лютеїнізуючий гормон)
microTESE	-	microdissection testicular sperm extraction (мікродисекція TESE)
NOA	-	nonobstructive azoospermia (необструктивна азооспермія)
OA	-	obstructive azoospermia (обструктивна азооспермія)
SCO	-	Sertoli cell-only syndrome (синдром клітин Сертолі)
SRR	-	sperm retrieval rate - частота вилучення сперматозоїдів
T	-	testosterone (тестостерон)
TESA	-	testicular sperm aspiration (аспірація сперматозоїдів з тканини яєчка)
TESE	-	testicular sperm extraction (тестикулярна екстаркція сперматозоїдів)

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Причини азооспермії та методи її подолання: TESA, TESE, micro-TESE	7
1.1. Типи азооспермії	7
1.2. Мікрodelеції в AZF-фрагменті	8
1.3. Захворювання, які призводять до азооспермії	10
1.4. Методи отримання сперматозоїдів з придатка яєчка та яєчка.....	12
1.4.1. Аспірація тонкою голкою (FNA) і TESA	13
1.4.2. Проста TESE і багаторазова TESE	14
1.4.3. Micro-TESE	15
1.5. Предикативні передопераційні фактори перед екстракцією сперматозоїдів	16
1.6. Зв'язок між рівнем гормонів у сироватці крові та вилученням сперматозоїдів	21
1.7. Гормональне лікування перед micro-TESE	22
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень	26
2.1. Хірургічне отримання сперматозоїдів	27
2.1.1. Процедура TESA	27
2.1.2 Процедура TESE.....	28
2.2. Обробка тканин	29
2.3. Заморожування і розморожування сперматозоїдів, отриманих після TESE.....	29
2.4. Метод ІКСІ для запліднення тестикулярними сперматозоїдами.....	30
2.5. Статистична обробка даних	32
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення	33
3.1. Аналіз рівня ФСГ у чоловіків як маркера при використанні методу TESE.....	33
3.2. Результати показників рівня ЛГ у чоловіків як біомаркеру TESE	37

3.3. Зміни рівня інгібіну В як непрямого маркера сперматогенезу.....	38
3.4. Дослідження рівня гормонів, які не вплинули на успішність TESE	40
3.5. Результати ІКСІ та частоти бластуляції у різних групах обстежених...	41
ВИСНОВКИ	49
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	50

ВСТУП

Чоловіче безпліддя є глобальною проблемою охорони здоров'я, і деякі дослідники висловлюють занепокоєння щодо «кризи сперми». Зараз приблизно 15% пар у всьому світі і приблизно 12% чоловіків у Сполучених Штатах є безплідними або субфертильними. У 50 % випадків чоловічого безпліддя значна роль припадає на безплідних чоловіків, серед яких у 10–15 % спостерігається азооспермія.

Розробка інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїдів (ICSI) у 1992 році відкрила нову еру в галузі допоміжної репродукції та зробила революцію в протоколах допоміжних репродуктивних технологій для пар із чоловічим фактором безпліддя (Palermo et al., 1992). Запліднення і вагітність можуть бути досягнуті за допомогою сперматозоїдів, виділених не тільки з еякуляту, але і з сім'яних каналців (Schoysman et al., 1993).

Хірургічні методи отримання сперматозоїдів застосовуються у випадках азооспермії обструктивної або необструктивної етіології. Примітно, що перша вагітність з використанням сперматозоїдів з придатка яєчка та стандартного запліднення *in vitro* була досягнута в 1985 році, а перші вагітності після запліднення за допомогою ICSI сперматозоїдами з ячок чоловіків з обструктивною азооспермією (OA) були зареєстровані в 1993 році.

Найпоширенішими методами отримання сперматозоїдів з ячок при необструктивній азооспермії (NOA) є аспірація сперматозоїдів з ячок (TESA: аспірація голкою/тонкою голкою) і відкрита біопсія ячок (екстракція сперматозоїдів з ячок: TESE). Оптимальна техніка екстракції сперматозоїдів має бути мінімально інвазивною та уникати пошкодження функції ячок. Мікродисекція TESE (micro-TESE) виконується за допомогою операційного мікроскопа, широко вважається найкращим методом вилучення сперматозоїдів при NOA, оскільки можна безпосередньо ідентифікувати більші та непрозорі каналці, імовірно, з активним сперматогенезом, що

призводить до вищих показників вилучення сперматозоїдів з мінімальною втратою тканини та нижчим рівнем післяопераційних ускладнень. Micro-TESE в поєднанні з ICSI застосовний у всіх випадках NOA, включаючи навіть синдром Клайнфельтера (KS) (Ishikawa, 2012).

До появи допоміжних репродуктивних технологій використання донорської сперматозоїдів було єдиним варіантом, який пропонував реальні шанси на зачаття для пар, в яких у чоловіка виявлено азооспермію. Підхід до пацієнтів із азооспермією суттєво змінився з впровадженням методів вилучення сперматозоїдів та ICSI, які надали нові можливості для досягнення вагітності за допомогою сперматозоїдів, отриманих з придатка яєчка або самого яєчка.

Метою кваліфікаційної роботи є аналіз частоти бластуляції ембріонів і настання вагітності при заплідненні сперматозоїдами, отриманих методом екстрації яєчок TESE у чоловіків з азооспермією.

Відповідно до мети були поставлені наступні завдання:

1. Порівняти частоту бластуляції ембріонів, отриманих при заплідненні кріоконсервованими сперматозоїдами та нативними з біопсійної тканини яєчка методом TESE.

2. Вивчити частоту бластуляції ембріонів після запліднення донорських та пацієнтських овоцитів тестикулярними сперматозоїдами, отриманих за методом TESE.

3. Порівняти частоту настання вагітності серед пацієнток при заплідненні сперматозоїдами, що отримані за методом TESE.

4. Проаналізувати результати ІКСІ при заплідненні овоцитів жінок сперматозоїдами, отриманих за допомогою методу TESE у чоловіків з азооспермією.

5. Визначити рівні гормонів у чоловіків з азооспермією та частоту настання вагітності у жінок при заплідненні сперматозоїдами, отриманих методом TESE.

РОЗДІЛ 1

ПРИЧИНИ АЗООСПЕРМІЇ ТА МЕТОДИ ЇЇ ПОДОЛАННЯ: TESA, TESE, MICRO-TESE

Чоловіче безпліддя є гетерогенним, багатофакторним і комплексним порушенням репродуктивної системи, що вражає 7–12% чоловіків із загальної популяції.

Відомо, що азооспермія (повна відсутність сперматозоїдів в еякуляті) може спостерігатися приблизно у 1% чоловіків й етіологію цього стану можна розділити на три великі категорії: гіпоталамо-гіпофізарна дисфункція, первинні кількісні сперматогенні порушення, обструкція уrogenітальних проток. Всі ці підгрупи можна віднести до вроджених і набутих факторів (Сіоррі et al., 2021).

Причини чоловічого безпліддя включають генетичні дефекти, токсичні речовини навколишнього середовища, травми, алкілююча хіміотерапія, які майже завжди призводять до безпліддя. (Khamrang et al., 2021).

1.1. Типи азооспермії

Азооспермію можна розділити на два типи: обструктивну азооспермію (ОА) і необструктивну азооспермію (NOA). ОА характерна для чоловіків з вазектомією, випадковим хірургічним перериванням сім'явиносних протоків або придатків яєчка під час операції, чоловіків з первинною обструкцією придатка яєчка, яка виникла внаслідок попередніх інфекцій, але при цьому відбувається нормальний сперматогенез в яєчках. NOA може бути наслідком первинного чи вторинного пошкодження яєчка або неповного його розвитку. NOA становить значну частку чоловічого безпліддя. Великий відсоток

чоловіків з NOA мають вогнища активного сперматогенезу аж до стадії округлих сперматид (Tekayev & Vuruskan, 2021).

У разі двосторонньої дистальної або проксимальної непрохідності сім'явиносних проток сперматогенний процес не змінюється, і цей патологічний стан називають обструктивною азооспермією. З іншого боку, первинна або вторинна недостатність яєчок призводить до необструктивної азооспермії (Cioppa et al., 2021).

Кожен раз, коли у пацієнта виявляють азооспермію після дослідження кількох зразків сперми, лікарі проводять пальпацію яєчок, вимірювання рівнів фолікулостимулюючого гормону (FSH) та тестостерону (Т).

На основі цих параметрів можна відрізнити чоловіків з обструктивною та необструктивною азооспермією з точністю >90%. При обструктивній азооспермії у чоловіків набряклі та тверді придатки яєчка і нормальні значення FSH. У цих чоловіків після біопсії можна знайти достатню кількість рухливих сперматозоїдів, придатних для ICSI. Чоловіки з високим рівнем FSH і м'якими малими яєчками, які є ознаками необструктивної азооспермії, є кандидатами для micro-TESE (Tanaka et al., 2018).

Хоча у пацієнтів з обструктивною азооспермією, швидше за все, можна отримати сперматозоїди за допомогою такої процедури, як аспірація сперматозоїдів з тканини яєчок (TESA), близько 60% чоловіків з азооспермією мають необструктивну азооспермію (NOA) і, отже, нижчі показники успішної операції.

1.2. Мікрodelеції в AZF-фрагменті

Дослідження мікрodelеції Y-хромосом показало, що така патологія спостерігається у 3-15% чоловіків з тяжкою олігозооспермією, а також у чоловіків з NOA. Чоловіча статеві хромосома відрізняється своїм розміром, геномною структурою, вмістом і еволюційною траєкторією.

Першу *de novo* делецію на довгому плечі Y-хромосоми (Yq) описали Тьєполо і Зуффарді у 1976 р., передбачивши наявність фактора(ів) азооспермії (AZF). Подальші дослідження визначили три моделі делеції в проксимальному, середньому та дистальному відділі Yq11, позначених як AZFa, AZFb і AZFc. Мікроделеції AZF, як правило, з'являються *de novo* і їх походження найчастіше, ймовірно, походить з яєчка батька пацієнта.

Найбільш часто видаляється субрегіон AZFc (близько 80%), за яким слідує AZFa (близько 0,5–4%), AZFb (близько 1–5%).

Мікроделеції AZF є добре відомими причинами чоловічого безпліддя, оскільки вони включають важливі гени, пов'язані зі сперматогенезом. Частота повної делеції AZF становить 1:4000 у загальній популяції, але вона зростає до 5–10% у пацієнтів, уражених NOA (Cioppi et al., 2021).

Скринінг делеції в AZF фрагменті є важливим для прогнозу операції TESE. Носії повних делецій AZFa і AZFb мають практично нульовий шанс знайти сперматозоїди в яєчках.

Щодо регіону AZFb, Stouffs і колеги (Stouffs et al., 2017) повідомили про 2 пацієнтів з підозрою на повну делецію AZFb, але у деяких чоловіків спостерігався залишковий сперматогенез. При розширенні аналізу делеції у цих пацієнтів, автори змогли підсилити специфічну дистальну STS (sY1192) область AZFb. Цей висновок свідчить про те, що збереження деяких копій багатокопійних генів, таких як PRY, RBMY, BPY2, DAZ може забезпечити залишковий сперматогенез і повне дозрівання. Тому є важливість тестування sY1192, адже якщо він присутній, можна спробувати TESE.

Що стосується носіїв мікроделеції AZFc, то сперматозоїди можна отримати за допомогою *micro*-TESE з яєчок з успішністю 50–60%. Мікроделеції Yq можуть бути пов'язані із загальною нестабільністю Y-хромосоми, яка може призвести до утворення клітинних ліній 45,X0. Каріотипування з пошуком мозаїцизму 45,X0/46,XY слід виконувати на периферійних лімфоцитах крові, оскільки мозаїцизм вважається негативним предиктором отримання сперматозоїдів при біопсії яєчка. Ізольовані делеції

AZFa, хоч і рідкісні, пов'язані з гістологічним малюнком клітин Сертолі без сперматозоїдів, а делеції AZFb найчастіше спостерігаються фокальною зупинкою дозрівання. Шталь та ін. обстежили 149 пацієнтів з мікрodelеціями та виявили, що частота вилучення сперматозоїдів становила 71,4% у чоловіків з делеціями AZFc, але сперматозоїди не було отримано в жодного чоловіка з делеціями AZFa, AZFb, AZFb + c або повними делеціями Yq.

1.3. Захворювання, які призводять до азооспермії

Синдром Клайнфельтера (KS) є найпоширенішим розладом статевих хромосом серед безплідних чоловіків із поширеністю 1 на 660 чоловіків і є частою причиною гіпогонадізму та безпліддя. KS може проявлятися уповільненим статевим дозріванням, збільшенням зросту, труднощами з навчанням і поведінкою, варикозним розширенням вен, ожирінням, діабетом, лейкемією, підвищеною ймовірністю позагонадних пухлин зародкових клітин і раку молочної залози. Приблизно 80% осіб із KS мають уніфікований каріотип 47,XXY (немозаїчний тип), а інші 20% мають або мозаїки 47,XXY/46,XY, або мають анеуплоїдію статевих хромосом вищого ступеня. Дослідження статевих гормонів зазвичай демонструють зниження рівня Т у сироватці крові та підвищення рівня LH і FSH (Josso et al., 2013).

Досі не зрозуміло, як додаткова X-хромосома впливає на сперматогенез. Було описано обширний фіброз і гіалінізацію сім'яних каналців з прогресуючим апоптозом 47XXY сперматогоній, що призводить до азооспермії раніше досягнення повноліття. Однак сперматогенез може все одно відбуватися в деяких сім'яних каналцях, що можна пояснити або низьким рівнем гоносомного мозаїцизму, або мозаїцизмом ячок через втрату додаткової X хромосоми під час мітозу (Cioppa et al., 2021).

У 1996 році було повідомлено про випадок немозаїчного KS, успішно вилікуваного за допомогою TESE. Tournaie et al також повідомили про

успішне вилучення сперматозоїдів у 4 із 9 пацієнтів із KS (44,4%) за допомогою звичайного TESE.

Було проведено декілька досліджень із застосуванням micro-TESE у пацієнтів із KS, Шифф та ін (Schiff et al., 2005) повідомили про вражаючий SRR (69,0%); однак ці випадки KS включали мозаїчних осіб. В статті було повідомлено про SRR 52,4% після micro-TESE у 21 пацієнта з немозаїчним KS. Повідомлялося, що вік пацієнта в успішному TESE у випадках KS значно молодший, ніж у невдалих випадках (Bernie et al., 2013).

Крипторхізм або неопущене яєчко визначається як одностороння або двостороння відсутність яєчок у мошонці та є наслідком неопущення яєчок у мошонку пренатально. Зустрічається у 2,4–5% новонароджених, частіше зустрічається у недоношених дітей (до 30%). Крипторхізм пов'язаний із високим рівнем чоловічого безпліддя, оскільки майже 10% чоловіків із проблемами фертильності мають анамнез UDT та орхідопексії, а 20–27% дорослих чоловіків страждають від азооспермії та 3–8% від оліго-тератоастеноспермії, у них раніше був діагностований порок яєчка. Частота безпліддя при односторонньому крипторхізмі може сягати 32% і зростає майже вдвічі при двосторонньому крипторхізмі, навіть після хірургічної корекції. Якщо не лікувати, приблизно у 89% пацієнтів із двосторонньою крипторхією розвивається азооспермія (Antinori et al., 1997).

Деякі дослідники вважають, що опущення яєчка є двофазним процесом, який контролюється як гормональними, так і механічними факторами (Fedder, 2011). Чоловіки з крипторхізмом мали хороші шанси отримати сперматозоїди під час micro-TESE. Насправді у чоловіків із крипторхізмом відсоток вилучення сперматозоїдів був дещо вищим (74%) порівняно з усіма іншими чоловіками з необструктивною азооспермією (58%), хоча різниця в частоті настання вагітності не була статистично значущою.

До того ж ще одна патологія як варикоцеле у чоловіків часто призводить до поганої якості сперми, а також до азооспермії. З цієї причини багато чоловіків з варикоцеле та азооспермією проходять лікування перед спробами

хірургічного вилучення сперматозоїдів. Однак варикоцелектомія для NOA все ще залишається суперечливою. Були повідомлення про те, що у чоловіків з азооспермією після варикоцелектомії збільшується вироблення сперматозоїдів більш ніж у половини пацієнтів, а також веде до виявлення сперматозоїдів в еякуляті (Bernie et al., 2013). Подібним чином, були як повідомлення про покращення швидкості вилучення сперматозоїдів після варикоцелектомії перед micro-TESE у пацієнтів з необструктивною азооспермією з клінічним варикоцеле, так і повідомлення про те, що варикоцелектомія у цих пацієнтів не покращує результати micro-TESE. Через ці суперечливі результати необхідність варикоцелектомії у чоловіків перед micro-TESE для отримання сперми залишається суперечливою. Haydardedeoglu та ін. (Haydardedeoglu et al., 2010) порівнювали чоловіків, які мали NOA та клінічне варикоцеле, з чоловіками з NOA та без варикоцеле. Вони виявили, що у чоловіків з варикоцеле, які перенесли варикоцелектомію, відмічається вищі показники вилучення сперматозоїдів порівняно з чоловіками з NOA і без варикоцеле, що свідчить про те, що відновлення варикоцеле у чоловіків з NOA може відігравати прогностичну роль в успішності micro-TESE.

1.4. Методи отримання сперматозоїдів з придатка яєчка та яєчка

Найпоширенішими методами отримання сперматозоїдів з яєчок є TESA і TESE. Черезшкірна аспірація сперматозоїдів з придатка (PESA), мікрохірургічна аспірація сперматозоїдів з придатка та тестикулярна аспірація сперматозоїдів (TESA) використовуються у випадках ОА, тоді як TESA та тестикулярна екстракція сперматозоїдів (TESE) застосовуються у випадках необструктивної азооспермії (NOA).

NOA вражає 10% безплідних чоловіків і діагностується у 60% чоловіків з азооспермією. Етіологія тестикулярної недостатності включає генетичні

розлади, такі як аномалії статевих хромосом, транслокації та мікроделеції Y-хромосоми, крипторхізм, перекрут яєчка, дія радіації та токсинів.

Сперматозоїди з яєчок можна отримати у деяких чоловіків з NOA через існування ізольованих вогнищ активного сперматогенезу, незважаючи на відсутність еякулованих сперматозоїдів у їхній спермі.

1.4.1. Аспірація тонкою голкою (FNA) і TESA

TESA була введена в 1995 році і пропагувалась як простіша та менш травматична процедура, ніж TESE. Пізніші модифікації TESA, голкова аспіраційна біопсія (NAB), дозволили відновити значну частину тканини яєчка, яку можна використовувати як для діагностики, так і для терапевтичних цілей. TESA не дуже точна, оскільки виконується наосліп; отже, вогнище сперматогенезу може бути пропущене (Majzoub et al., 2021).

Левін та ін. успішно виконали FNA яєчок від пацієнта із зупинкою дозрівання (MA) і підвищеним рівнем гонадотропінів. Щоб уникнути післяопераційного пошкодження яєчок, використовували голкову біопсію за допомогою біопсійного пістолета та голкову аспірацію. Були описані різні техніки з різним діаметром голки та кількістю проколів яєчок.

Основними перевагами методів FNA і TESA є їхня простота, низька вартість і мінімальна інвазивність, а також менший післяопераційний біль у порівнянні з багаторазовими TESE.

Крім того, було припущено, що FNA може збільшити шанси знайти місце активного сперматогенезу, досягнувши глибших ділянок яєчка. Проте кілька контрольованих досліджень (Deruyver et al., 2014), (Majzoub et al., 2021) показали значно нижчий SRR порівняно з простим або множинним TESE.

Разом з тим недоліком FNA і TESA є те, що часто немає надлишкових сперматозоїдів для кріоконсервації через обмежену кількість отриманих сперматозоїдів.

1.4.2. Проста TESE і багаторазова TESE

Проста TESE (відкрита одиночна біопсія) є основною процедурою для NOA, виходячи з припущення, що у пацієнтів з NOA присутній мультифокальний розподіл сперматогенезу по всьому яєчку. Один розріз і великий об'єм тканини має високу частоту вилучення сперматозоїдів, але також призводять до збільшення втрати об'єму яєчка.

Взяття кількох зразків з різних ділянок яєчка може збільшити ймовірність виявлення вогнища активного виробництва сперматозоїдів.

Окрім того, підхід до багаторазової біопсії забезпечує значно вищий SRR порівняно з одноразовою біопсією (49% проти 37,5%). Взяття кількох біопсій також може збільшити ймовірність виявлення рухомих сперматозоїдів, оскільки було показано, що в 35% випадків лише нерухомі сперматозоїди були виявлені в одному місці, а рухливі сперматозоїди були знайдені в інших. Щодо місця біопсії, Hauser et al. не виявили жодної переваги будь-якої конкретної ділянки яєчка після виконання біопсії на верхньому полюсі, середній лінії та проксимальному полюсі, тоді як Witt et al. дійшли висновку, що середня частина яєчка забезпечує найвищий SRR (Hauser et al., 2006).

Багаторазові TESE слід проводити обережно, оскільки ці втручання можуть порушити кровопостачання в достатній мірі, що призведе до ризику деваскуляризації яєчок і призведе до постійного дефіциту андрогенів (Corona et al., 2019).

1.4.3. Micro-TESE

Micro-TESE — це вдосконалена версія TESE, яка застосовує мікрохірургічні методи та операційний мікроскоп для ідентифікації окремих сім'яних каналців, які містять активний сперматогенез. Micro-TESE збільшує кількість сперматозоїдів на біопсію, призводить до меншого видалення тканини (і втрати яєчка) і дозволяє ідентифікувати кровоносні судини в яєчку, мінімізуючи ризик їхнього випадкового пошкодження. Таким чином, micro-TESE базується на принципі виявлення найдосконалішого, хоча і не обов'язково переважного, місця сперматогенезу в яєчку (Donoso et al., 2007).

З іншого боку, хоча невелика кількість тканини яєчка імовірно екстрагується під час micro-TESE, процедура може мати шкідливий вплив на функцію яєчка, про що свідчить тимчасовий або постійний стан гіпогонадізму після операції. Крім того, micro-TESE є дорогою, займає багато часу та потребує кваліфікованого мікрохірурга (Majzoub et al., 2021).

Під час операції у мошонці робиться серединний розріз, розкривається оболонка і візуалізується яєчко, вкрите білковою оболонкою. Решта процедури виконується під операційним мікроскопом. Після розтину білкової оболонки проводиться безпосередній огляд паренхіми яєчка при збільшенні $\times 15$. З каналців вирізають невеликі проби (5–10 мг). Якщо в початковому зразку не виявлено сперматозоїдів, наступні зразки беруться з того самого яєчка і, якщо необхідно, з контралатерального яєчка. Розтин проводять через усі ділянки тканини яєчка. Процедуру припиняють після вилучення сперматозоїдів або якщо вважається, що подальше розсічення може загрожувати кровопостачанню яєчок.

Фокальний сперматогенез можна виявити в розширених і непрозорих сім'яних каналцях, оточених зморщеними каналцями або фіброзною тканиною у пацієнтів KS.

У 1999 році в першому звіті про цю методику порівнювалися 22 пацієнти, які пройшли стандартну багаторазову біопсію, з групою з 27 чоловіків, які пройшли micro-TESE. Автор описав значне покращення SRR при виконанні micro-TESE (63% проти 45%). Порівняльне дослідження, яке включало 116 чоловіків, виявило значно вищий SRR із додаванням оптичного збільшення порівняно зі звичайним TESE (47% проти 30%), що вказує на ефективність micro-TESE для отримання сперматозоїдів. На сьогоднішній день найбільша серія досліджень micro-TESE повідомила про результати 792 процедур, які досягли SRR 60% (Deruyver et al., 2014).

1.5. Предикативні передопераційні фактори перед екстракцією сперматозоїдів

Кілька досліджень досліджували прогностичні фактори для успішного хірургічного SR за допомогою звичайного TESE або micro-TESE. Найчастіше досліджували такі клінічні фактори, як вік, об'єм ячок, рівень сироваткового FSH, LH, інгібіну В та Т, результати були суперечливі. Тестикулярна гістопатологія вважається важливим предиктором успішного SRR, незважаючи на це, у багатьох випадках така інформація недоступна. Генетичні аномалії, такі як мікрделеції AZF і аберації каріотипу, також мають вплив; однак їх можна виявити лише у 15% чоловіків з NOA.

Більші яєчка часто вважалися ознакою нормального сперматогенезу. Маленькі та атрофічні яєчка спостерігаються у багатьох чоловіків з NOA. Хоча маленькі яєчка можуть представляти глобальну модель поганого сперматогенезу, об'єм ячок може не передбачити наявності каналців зі сперматогенезом, які ідентифікуються за допомогою micro-TESE.

Пацієнти із середнім розміром яєчка $>7,75$ мл і рівнем FSH у сироватці $<8,5$ МО/л мали TESE-позитивний SR 43%. Повідомлялося, що немає статистично значущої різниці в об'ємі ячок між пацієнтами з NOA, у яких

можна було отримати сперматозоїди, та пацієнтами, у яких це не вдалося. До того ж, не було визначено нижньої межі об'єму яєчка для відсутності сперматозоїдів.

Вікові зміни в яєчках людини зазвичай включають зменшення розміру яєчок, порушення сперматогенезу, зменшення довжини канальців, склероз, підвищену частоту азооспермії. Не було визначено конкретного чоловічого граничного віку, коли б це негативно впливало на фертильність. Незважаючи на це, існує припущення, що похилий вік батька призводить до зниження рівня вагітності та народжуваності, коли чоловікам 45-50 років і старше.

Інгібін В - глікопротеїновий гормон, що виробляється клітинами Сертолі в яєчках. Він діє як негативний регуляторний фактор на FSH і згодом виявляється низьким у чоловіків з тестикулярною дисфункцією та низьким рівнем сперматогенезу. Через це було виявлено, що інгібін В добре корелює зі ступенем сперматогенезу (Duvilla et al., 2008).

Можливо, найсильнішим провісником успішного вилучення сперматозоїдів є гістопатологія яєчка, адже побачена картина часто може вказувати на виробництво сперматозоїдів. Важливо враховувати, чи аналізована гістологічна картина була найдосконалішою чи переважаючою, оскільки два аналізи можуть надати дуже різну інформацію щодо пацієнта.

Було показано, що чоловіки з лише клітинним синдромом Сертолі (SCO) мають набагато нижчу вірогідність отримання сперматозоїдів порівняно з чоловіками з переважно гіпосперматогенезом (HS) і зупинкою дозрівання (MA).

Загалом сироваткова концентрація FSH обернено корелює з порушенням сперматогенезу. Недавні дослідження з використанням багатьох методів TESE показали, що підвищений рівень FSH пов'язаний з низькою ймовірністю вилучення сперматозоїдів у чоловіків. Хоча FSH відображає переважний патерн сперматогенезу, він може не відображати окремі ділянки сперматогенезу всередині яєчка. Концентрація FSH у сироватці крові не пов'язана з більш просунутими стадіями сперматогенезу.

Зв'язок між FSH і наявністю будь-якого сперматогенезу не є однозначним у чоловіків з NOA, включаючи чоловіків із KS. Нижчий рівень FSH може бути відображенням більшої кількості клітин Сертолі у більшому яєчку, що забезпечує більший контрольний зворотний зв'язок для придушення вироблення FSH. Чудові результати з вищими рівнями FSH можуть відображати чутливість мікродиссекції при виявленні невеликих ділянок виробництва сперматозоїдів. Ці висновки ще більше ілюструють, що FSH не здатний вирішувати долю сперматогенезу на рівні окремих каналців, і тому його не слід використовувати як предиктор отримання сперматозоїдів (Siegel et al., 2013).

FSH - це глікопротеїн, який секретується фолітропоцитами аденогіпофіза після стимуляції гонадоліберіном, що синтезується у ядрах гіпоталамуса. Він здійснює свою дію шляхом зв'язування з рецепторами на клітинах Сертолі в яєчках, що призводить до вироблення інгібіну та активіну і поживних речовин, необхідних для дозрівання зародкових клітин. Завдяки цьому механізму дії багато хто припускає, що FSH може бути корисним для прогнозування результатів процедур вилучення сперматозоїдів, оскільки пацієнти з дуже високим рівнем FSH мають глобальну недостатність виробництва сперматозоїдів в яєчках (Sprahovic et al., 2017).

Рівні FSH суттєво відрізняються у пацієнтів, у яких сперматозоїди в ході операції були отримані, було показано, що у чоловіків з азооспермією з високим вмістом FSH SRR нижчий. У дослідженні (Jahromi et al., 2020) чоловіки з NOA, які отримували терапію чистим FSH, мали майже вдвічі більшу ймовірність отримати сперматозоїди під час процедури (64% проти 33% SRR в групі лікування порівняно з контрольною групою), незважаючи на відсутність змін у рівнях FSH у чоловіків, які отримували лікування.

Роль FSH у модуляції сперматогенезу була предметом дискусій, оскільки дослідження на п'ятьох чоловіках з інактивуючою мутацією гена рецептора FSH (FSHR) показало, що жоден не мав азооспермії і двоє мали

дітей. Це відкриття спонукало деяких дослідників припустити, що FSH не є необхідним для сперматогенезу, але висновок про те, що чоловіки з інактивуєчими мутаціями в бета-субодиниці FSH були повністю азооспермічними, поставив під сумнів цю гіпотезу. Подальші дослідження показали, що мутантний FSHR не є повністю неактивним, тому залишкова дія FSH може сприяти сперматогенезу, і що мутації в гені FSH є більш серйозними, ніж мутації FSHR (Ruwanpura et al., 2010), (Tapanainen et al., 1997).

Дослідження на мишах з нокаутним FSH (FSHKO) або FSHR (FSHRKO) чітко продемонстрували, що FSH необхідний для збільшення кількості сперматогоніїв і сперматоцитів. FSH також діє як фактор виживання сперматогоній, оскільки гостре пригнічення FSH індукує сперматогоніальний апоптоз.

За відсутності FSH або FSHR кількість клітин Сертолі зменшується приблизно на 30–45% порівняно з нормальним розвитком яєчка: оскільки клітина Сертолі здатна підтримувати певну кількість статевих клітин, кількість клітин Сертолі визначає кількість вироблених сперматозоїдів. Це може пояснити, чому миші FSHRKO мають повний сперматогенез, але кількість статевих клітин нижча, ніж у тварин дикого типу.

Дослідження у чоловіків із вродженим гіпогонадотропним гіпогонадизмом свідчать про те, що попереднє лікування лише FSH перед комбінованим лікуванням гонадотропінами посилює сперматогенез. Однак FSH сам по собі не здатний сприяти сперматогенезу за межами пахітенових сперматоцитів: нещодавнє дослідження на мишах SCARKO продемонструвало, що для виживання сперматоцитів у профазі мейоза необхідна передача сигналів рецепторів андрогенів (AR) клітин Сертолі, оскільки миші SCARKO продемонстрували втрату мейотичних зародкових клітин, і неможливість прогресування вцілілих сперматоцитів. Події ранньої мейотичної профазі не залежать від передачі сигналів андрогенів, отже, синапсис хромосом і рекомбінація відбувалися зазвичай у вцілілих

сперматоцитах, які увійшли в мейотичну профазу; проте було виявлено, що пахітенові сперматоцити SCARKO набувають аберантних транскриптомних ознак (стан транскриптома лептотену або зиготени) і не прогресують до наступних транскриптомних підписів (Siegel et al., 2013; Zeadna et al., 2020).

Також виявлено, що FSH підтримує сперматогенез незалежно від тестостерону; це випадок трансгенних самців мишей з активуючою мутацією FSHR, яка уможливила сильну активацію FSH (відповідь цАМФ у 10 разів вище базальної) (Cagorro & Colpi, 2021).

Однак у нормальних умовах передача сигналів тестостерону необхідна для того, щоб сперматогенез продовжувався після мейозу. Передача сигналів тестостерону також сприяє підтримці тісних зв'язків між сусідніми клітинами Сертолі (необхідними для бар'єру між кров'ю та яєчками) та спеціальним середовищем для статевих клітин, головним чином через його модуляцію мікро-РНК, які націлені на гени, необхідні для реструктуризації клітинних з'єднань і Сертолі-зародкова клітина. адгезія.

Відсутність Т призводить до порушення гематотестикулярного бар'єру, передчасного відшарування сперматид від клітин Сертолі та блокування вивільнення зрілих сперматозоїдів від клітин Сертолі з наступним фагоцитозом зародкових клітин клітинами Сертолі.

Відомо, що Т виробляється клітинами Лейдіга у відповідь на LH і опосередковує його вплив через AR, що експресується клітинами Сертолі класичним і некласичним шляхами.

Було класично продемонстровано, що внутрішньотестикулярна концентрація тестостерону (ІТТ) набагато вища (у 50–100 разів), ніж циркулюючі рівні, однак сперматогенез може підтримуватися за рахунок дуже низької концентрації ІТТ: миші з інактивацією рецептора LH (миші LuRKO) мали незмінний сперматогенез, незважаючи на дуже низькі рівні ІТТ. Крім того, нещодавнє дослідження показало, що сперматогенез у мишей LuRKO можна нормалізувати за допомогою екзогенного тестостерону.

Отже, взаємозв'язок між рівнями Т у сироватці крові та інтратестикулярним рівнем ще далеко не встановлений, тому необхідні подальші дослідження (Vahidi et al., 2021).

І FSH, і Т необхідні для синергічного впливу на сперматогенез. FSH регулює транскрипти, необхідні для нормальної функції яєчок, включаючи ген StAR, який необхідний для синтезу стероїдів, а також стимулює вироблення клітинами Сертолі андрогензв'язуючого глобуліну, що допомагає підтримувати високу концентрацію Т в яєчках. З іншого боку, вважається, що Т модулює складність олігосахаридів гіпофізарного FSH; кастрація викликає зміни в олігосахаридному складі гіпофізарного FSH як у препубертатних, так і у дорослих тварин, а введення флутаміду, здатного перешкоджати зв'язуванню андрогенів з AR як на периферії, так і на гіпоталамо-гіпофізарному рівні, призводить до переважання варіантів глікозилювання циркулюючого FSH. несуть неповні олігосахариди. Застосування тестостерону енантату пацієнтам пубертатного віку не змінює рівні FSH у сироватці крові, але призводить до значного збільшення частки FSH, що містить комплекс олігосахаридів.

1.6. Зв'язок між рівнем гормонів у сироватці крові та вилученням сперматозоїдів

Рівні FSH у сироватці крові зазвичай високі у чоловіків з NOA, і хоча нижчі рівні можуть бути виявлені у тих пацієнтів, які теоретично можуть отримати користь від гормонального лікування, наприклад, у пацієнтів з гістологією яєчок, що виявляє гіпосперматогенез (ГІПО) або зупинку дозрівання (МА), їх не можна використовувати для надійного прогнозування цих станів до операції. Нижчі рівні FSH не завжди є прогностичним фактором непорушеного сперматогенезу у пацієнтів з NOA. Навпаки, виявлено, що мікро-TESE ефективніший у пацієнтів із вищим рівнем FSH у

сироватці крові (>15 мМО/мл) порівняно з тими, у кого рівень FSH у сироватці нижчий. Високі або дуже високі рівні FSH у сироватці крові не повинні перешкоджати використанню екзогенного FSH для стимуляції сперматогенезу; хоча було класично продемонстровано, що такий стан може спричинити десенсибілізацію сигналізації клітин Сертолі (Spahovic et al., 2017).

Вимірювання ІТТ є кориснішим, ніж аналіз рівня Т у сироватці крові. Аспірація яєчка не завжди здійсненна та доцільна через можливий невід'ємний ризик такої процедури (біль, кровотеча, інфекція та пошкодження яєчок), тому були зроблені спроби індивідуального сироваткового біомаркера, здатного ідентифікувати чоловіків з недостатнім ІТТ та служити для моніторингу рівня ІТТ після гормонального лікування. Оскільки більша частина циркулюючого 17-гідроксипрогестерону (17ОН-Р) у чоловіків, ймовірно, має походження з яєчок, було припущено, що сироватковий 17-ОНР може відображати рівні ІТТ. Сироватковий 17-ОНР не корелював з ІТТ на початковому рівні, але після лікування hCG був виявлений сильний зв'язок між ними у чоловіків, які отримували 250 або 500 МО hCG (Ramasamy et al., 2009).

Але діагностичну точність аналізу 17-ОНР як маркера ІТТ слід перевірити у більших вибіркових дослідженнях перед їх впровадженням у клінічну практику.

1.7. Гормональне лікування перед micro-TESE

Введення екзогенних гонадотропінів класично було визнано ефективним у відновленні сперматогенезу у чоловіків із азооспермією та гіпогонадотропним гіпогонадізмом. Отже, гормональне лікування чоловіків з NOA проводилося з метою покращення сперматогенезу перед операцією, незважаючи на те, що у цих пацієнтів можуть спостерігатися високі рівні

FSH і LH. Насправді було продемонстровано, що у цих пацієнтів клітини Лейдіга відповідають на стимуляцію високою дозою hCG збільшенням продукції тестостерону. Автори продемонстрували, що пацієнти з NOA демонструють змінену амплітуду імпульсу гонадотропіну, і припустили, що ця слабка активність ендogenous гонадотропіну може бути наслідком десенсibilізації клітин-мішеней (наприклад, клітин Сертолі та Лейдіга). Дійсно, інші дослідження продемонстрували, що у чоловіків з NOA спостерігаються аномалії частоти та амплітуди пульсу гонадотропінів, однак ці результати, ймовірно, є наслідком зміненої осі гіпоталамус–гіпофіз–гонади через зниження рівня тестостерону та сигналів зворотного зв'язку інгібіну В. Було продемонстровано, що десенсibilізації клітин Сертолі не відбувається, але гормональна реакція під час лікування FSH зберігається завдяки рециркуляції рецепторів FSH. Отже, можна припустити, що принаймні підгрупа чоловіків з NOA, наприклад ті, у кого рівень Т у сироватці крові нижче норми, можуть мати змінену секрецію ендogenous гонадотропіну, що виправдовує використання екзогенних гонадотропінів або селективних модуляторів рецепторів естрогену (SERM) (Takahashi et al., 2019).

Дійсно, Shinjo та ін. виявили, що лікування hCG значно підвищувало рівні ІТТ у пацієнтів з NOA; хоча ІТТ не відрізнявся серед тих, хто мав SSR або невдачу отримання сперматозоїдів (SRF), чоловіки з SSR мали значно нижчі базальні рівні ІТТ порівняно з чоловіками, які мали SRF. Це може підкріпити гіпотезу про те, що гормональна стимуляція необхідна для чоловіків із субнормальним рівнем Т для оптимізації отримання сперматозоїдів. Проте введення лише hCG, хоча й є ефективним для покращення SSR, може бути недостатнім для сприяння сперматогенезу у чоловіків з NOA; чоловіки, які отримували лише FSH, мали підвищену експресію ядерного антигену сперматогоніальних проліферуючих клітин, білка, який бере участь у механізмах відновлення нуклеотидів, помітно експресованих у ядрах мітотично активних сперматогоніїв. Окрім того, було продемонстровано, що експресія AP на клітинах Сертолі збільшувалася після

стимуляції FSH з hCG, що підтверджує попередню демонстрацію ролі FSH у регуляції експресії AP клітин Сертолі (Vloeberghs et al., 2015).

Два найбільших вибіркового дослідження дали суперечливі результати, наприклад, у дослідженні Reifsnnyder et al., SRR не відрізнявся серед чоловіків із субнормальними рівнями Т, які отримували гормональне лікування (N = 307) або не отримували лікування (N = 41), тоді як у дослідженні Hussein та ін., SRR був значно вищим у чоловіків, які отримували гормональне лікування (N = 496) порівняно з тими, хто не отримував лікування (N = 112), і 10,9% пацієнтів, які отримували лікування, мали сперматозоїди в еякуляті після лікування.

Слід зазначити, що рівні Т після лікування суттєво відрізнялися в різних дослідженнях, оскільки в дослідженні Reifsnnyder 82% пацієнтів, які отримували лікування, відповіли на гормональну терапію рівнем Т у сироватці щонайменше 250 нг.

Іншим показанням до гормонального лікування у чоловіків з NOA вважається гістологічна картина яєчок. Kato та його колеги спостерігали, що чоловіки з ранньою МА мали нижчий індекс SRR порівняно з тими з пізньою МА; тому лише пацієнти з пізньою МА можуть відповісти на гормональне лікування (Herndon et al., 2022).

Оптимізація рівнів Т у сироватці може бути показана у чоловіків з гіпогонадізмом перед micro-TESE. Однак через продемонстрований поганий зв'язок між рівнями Т у сироватці крові та інтратестикулярним, а також через відносно низький ІТТ, необхідний для сперматогенезу, цільові рівні Т у сироватці крові, яких необхідно досягти для покращення сперматогенезу, не зрозумілі. З цієї точки зору, демонстрація того, що рівні 17 OHP і INSL3 в сироватці певною мірою пов'язані з рівнями ІТТ, може прокласти шлях для нового напрямку досліджень. Крім того, можлива прогностична роль рівня біологічно активного Т (біо Т = вільний Т + зв'язаний з альбуміном Т) на SRR заслуговує на подальші дослідження (Caroppo & Colpi, 2021).

Дані свідчать про те, що гормональне лікування може бути виправданим у пацієнтів з гіпогонадізмом; з іншого боку, наявних доказів недостатньо, щоб рекомендувати гормональну терапію як стандартну клінічну практику для покращення швидкості вилучення сперми у пацієнтів з необструктивною азооспермією.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Відповідно до мети кваліфікаційної роботи магістра було проведено ретроспективне одноцентрове дослідження у медичному центрі репродуктивної медицини «Айвімед» протягом 2 років із 2020 до 2022 року.

Нами проаналізовано медичні карти 42 пацієнтів з обструктивною та необструктивною азооспермією, які проходили TESE та PESA, під час яких було отримано живі рухливі сперматозоїди, у пацієнтів в карті були вказані рівні гормонів, а у жінок протоколи ДРТ з ростом ембріонів та їхнім подальшим ембріотрансфером. Також було залучено 7 чоловіків, у яких не було отримано сперматозоїдів, натомість були отримані їхні попередники – округлі сперматиди.

Середній вік хворих на азооспермію становив $41,12 \pm 1,38$ років, діапазон 25-68 років. Більшість чоловіків мали ідіопатину азооспермію, але у деяких був стан після вазектомії, варикоцеле, хіміотерапії, у цих пацієнтів була можливість отримати сперматозоїди, а от при синдромі Клайнфельтера, гіпогонадотропному гіпогонадизмі, орхіектомії, отримувати тільки округлі сперматиди, при атрофії яєчок не були отримані навіть нормальні сім'яні каналці.

PESA при обструктивній азооспермії була проведена у 14 пацієнтів, а TESE – у 27 пацієнтів, серед них у більшості спостерігалась саме необструктивна азооспермія, і тому на такій TESE можна було отримати зовсім невелику кількість нерухливих сперматозоїдів.

Усім хворим проводили повне клінічне обстеження, включаючи загальне та локальне обстеження статевих органів.

Були проведені наступні лабораторні дослідження під час першого візиту: імуноферментним методом визначено ФСГ (нормальний діапазон = 0,7-14,9 мМО/л), ЛГ (нормальний діапазон = 1,5-9,3 мМО/л), тестостерон (нормальний діапазон = 1,5-9,3 нмоль/л), естрадіол (нормальний діапазон <56

пг/мл) та інгібін В (25,0-325,0). Імуноферментний аналіз виконувався тестом IMMULITE 2000, він є твердо фазним двонаправленим хемілюмінесцентним кількісним імунологічним аналізом.

Тестування каріотипу проводили за допомогою смуг Гімзи, а мікрделеції AZF виявляли за допомогою мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) ампліфікації дев'яти цільових сайтів Y-хромосоми.

Дослідження цих параметрів здається доцільним, оскільки розмір яєчка та рівень гормонів можуть опосередковано відображати ступінь сперматогенезу та функції яєчка.

2.1. Хірургічне отримання сперматозоїдів

До того, як пацієнти проходили тестикулярну екстракцію, їхній рівень тестостерону і співвідношення тестостерон:естрадіол були оптимізовані за допомогою таких ліків, як модулятори рецепторів естрогену, інгібітори ароматази або аналоги гонадотропіну.

Для пацієнтів з NOA — протоколи гормонального лікування (тестостерон деп., кломіфен в таблетках, 5000 МО hCG або rhFSH 75IU підшкірно) принаймні від трьох до шести місяців.

Операції проводили під місцевою анестезією з блокадою сім'яного канатика лідокаїном (2%) та внутрішньовенною анестезією пропофолом.

2.1.1. Процедура TESA

За даними літератури FNA зазвичай виконується в 1–6 різних зонах яєчка, зокрема у центрі яєчка та у верхньому та нижньому полюсах, з метою аспірації тканини яєчка з глибини яєчка.

Після стабілізації яєчка та розтягування шкіри мошонки голку вводять у передню поверхню яєчка та застосовують негативний тиск. Підтримуючи негативний тиск, голку частково витягують і знову вводять під різними кутами.

Процедуру проводили з використанням венозної канюлі калібру 18. Яєчко підтримували однією рукою, і канюлю вводили на передню поверхню яєчка, щоб уникнути травми придатка яєчка. Голку канюлі витягували, залишаючи катетер всередині яєчка, який з'єднували з 20-см 3 шприцом за допомогою подовжувальної трубки. Для промивання подовжувальної трубки використовували середовище Flushing (з HEPES) і кількість від 1 до 2 мл зберігалася в шприці. Відсмоктування застосовувалося відтягуванням поршня шприца. Потім катетером маніпулювали, зберігаючи один напрямок і застосовуючи обертальний рух і рух тягнучи/штовхаючи в тканині яєчка, доки не можна було спостерігати повернення непрозорого матеріалу.

2.1.2 Процедура TESE

Загалом для TESE білкову оболонку розрізають поперечно в кількох місцях у центрі, верхньому та нижньому полюсах кожного яєчка. Потім яєчко обережно стискають і січуть виступаючі тканини, кожна вагою приблизно 50–100 мг.

Після доставки яєчка через розріз стінки мошонки робиться поперечний розріз оболонки, щоб відкрити паренхіму яєчка. Під операційним мікроскопом досліджують сім'яні каналці. Лише розширені каналці були взяті на біопсію та досліджені на наявність сперматозоїдів.

Розсічення та біопсію продовжували до досягнення адекватного SRR. Якщо розширених каналців не було виявлено, було взято кілька випадкових зразків біопсії з усіх відділів яєчок. Отримані тканини поміщали в чашки з центральними лунками, що містили від 1 до 2 мл середовища сперми. Потім

туніку закривали нерозсмоктуючими швами. Процедуру повторювали для іншого яєчка, якщо з першого яєчка не вдалося отримати сперматозоїди.

2.2. Обробка тканин

Отриману тканину обробляли за допомогою стерильної техніки та під ламінарним потоком. Згинаючи голки шприців, щоб вони були перпендикулярні до поверхні чашки, та дивлячись у мікроскоп, вичавлювали вміст сім'яних каналців наступним способом: одним шприцем необхідно зафіксувати каналець, а іншим шприцем – розтягувати каналець та вичавлювати його вміст в середовище. Потім отриману рідину переносили в осад і центрифугували при 2000 RPM протягом 5 хвилин. Після видалення супернатанту осад ресуспендували в 0,3-0,5 мл середовища для промивання сперми, і суспензію досліджували під інвертованим мікроскопом на наявність сперматозоїдів.

2.3. Заморожування і розморожування сперматозоїдів, отриманих після TESE

Отримані зразки промивали в чашці Петрі, що містить 3 мл середовища HTF HEPES 0.4% HSA, Gynotec. Чашки оглядали при збільшенні $\times 400$ за допомогою інвертованого мікроскопу Integra для пошуку сперматозоїдів. Потім вміст чашки аспірують та біолог-андролог збирає шматочки тканини яєчка та середовище із чашки, в якій вони досліджувалися в стерильну піпетку. В кожен криовайл (Thermo NUNC VIAL) необхідно помістити по 1 мл середовища з біопсійною тканиною, додати покрупинно за допомогою шприца 0.7-0.8 мл SpermFreeze, Fertipro або SpermCryo All-round, Gynotec та пальцем ніжно потрушувати вайл для перемішування, в кінці після закриття

вайла ще раз перемешіти вміст вайлу 1 раз, порухавши його вперед і назад. Середовище має бути кімнатної температури для запобігання холодового шоку. Вайли необхідно потримати при кімнатній температурі протягом 10 хв, потім потримати в парах азоту для повільного зниження температури (мінімум 15-20 хв), в кінці вайли кріпляться на кріокейни та опускаються і зберігаються в рідкому азоті при -196°C .

Під час розморожування вайл достатньо залишити при кімнатній температурі, через 15 хв він повністю розморозиться або помістити в теплу камеру при 37°C для швидшого розморожування. Стерильною піпеткою біолог-андролог забирає середовище зі шматочками тканини із кріовайла або чашки та переносить на градієнт щільності (Sperm Filter, Ready-to-use gradient 80% та 45%, Gynotec), за умови якщо попередньо під час біопсії було знайдено багато рухливих сперматозоїдів, або в стерильну пробірку, додавши в 2 рази більше середовища (HTF HEPES 0.4% HSA, Gynotec), суспендуючи в останньому варіанті (якщо під час біопсії отримали одиночні сперматозоїди або більшість з них нерухливі). Пробірку з тканиною центрифугують при 2000 обертів/хвилину 12-15 хвилин. Відбирають надосадову рідину, додають 2,5 мл чистого середовища (HTF HEPES 0.4% HSA, Gynotec) та центрифугують ще 10 хвилин при 1000 обертів/хвилину. Відбирають надосадову рідину, залишаючи 0,5 мл середовища з тканиною та залишають при кімнатній температурі.

Паралельно в день запліднення відбувається пункція у партнерки чи розморозка ооцитів.

2.4. Метод ІКСІ для запліднення тестикулярними сперматозоїдами

Процедура ICSI відбувається через 2-6 години після пункції (пункція через 34 години після тригеру).

Холдингова піпетка та ін'єкторна голка приєднуються до ін'єкторів станції для ICSI. На збільшенні $\times 20$ мікропристрої виводяться в центр поля зору за допомогою грубого налаштування мікроманіпуляторів.

Кілька крапель (від 6 і більше), які містять ~ 10 мкл середовища (HTF Перес, Gynotec або HTF 0,4% HSA, Gynotec) розташовуються двома доріжками в чашці для ICSI. Справа розташовуємо доріжку з PVP (10% PVP in Fercult Flushing Medium) об'ємом 10-20 мкл для завантаження сперматозоїдів та зверху доріжки формуємо невелику краплю з PVP (5 мкл). Краплі обережно покриваються олією до повного покриття крапель. Чашки для ICSI інкубується за температури 37°C в інкубаторі мінімум 30 хвилин до поміщення в неї біологічного матеріалу.

Спочатку в доріжку з PVP завантажуюмо відміту суспенію сперматозоїдів (2-20 мкл, Eppendorf, Germany).

Використовуючи капіляр діаметром 300 мікрон, поміщаємо по кілька ооцитів (1-4) в краплі з середовищем.

При позиції хвостика сперматозоїда 90° відносно ін'єкторної голки підіймаємо її, а потім притискаємо хвостик до дна чашки. Різким рухом вправо перетираємо хвостик сперматозоїда до утворення хвостом сперматозоїда кута, який свідчить про пошкодження оболонки. При аспірації сперматозоїда в ін'єкторну голку першим затягується в піпетку хвіст.

Для пошуку ооцита збільшення переводиться на $\times 200$, надалі знову переводиться на $\times 400$. Ооцит за допомогою обох піпеток обертається для розташування полярного тіла на 12 або 6 годину.

Коли екваторіальна площина ооцита розташована, глибина холдингової піпетки регулюється для того, щоб вона була в одній площині з ооцитом та ооцит торкався дна чашки.

Перед ін'єкцією спускаємо зайву кількість середовища з PVP з піпетки. Ін'єкція відбувається на 3 годину, коли ооцит правильно розташований.

Після ін'єкції починаємо всмоктувати оолему в ін'єкційну піпетку. Розрив оолеми супроводжується різким пришвидшення затікання

цитоплазми ооцита в ін'єкторну піпетку, після чого ембріолог припиняє процес аспірації та випускає всмоктану цитоплазму та один сперматозоїд всередину ооцита.

Після цього запліднені ооцити перекладають в чашки для культивування.

2.5. Статистична обробка даних

Для статистичної обробки експериментальних даних та візуалізації результатів використовували програму «Origin» (OriginLab Corporation, США).

Розраховували середнє арифметичне значення (M) та середнє квадратичне відхилення (δ). Тип розподілу даних у групах перевіряли за критерієм Shapiro-Wilk.

Оскільки дані були розподілені нормально, тому для порівняння двох незалежних вибірок застосовували Two-Sample t-Test.

Достовірною вважалась різниця на рівні значущості $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Аналіз рівня ФСГ у чоловіків як маркеру при використанні методу TESE

Відповідно до мети даної випускної кваліфікаційної роботи ми порівнювали рівні гормонів серед пацієнтів, жінки яких завагітніли після запліднення сперматозоїдами, отриманих методом TESE та які не завагітніли, а саме гонадотропні гормони аденогіпофіза ЛГ і ФСГ, пролактин, тестостерон загальний, естрадіол та інгібін В. А також визначали, чи є різниця між рівнем бластуляції ембріонів у пацієнтів, які завагітніли та ні. Ми проводили кореляційний аналіз між частотою бластуляції та рівнем гормонів.

Слід зазначити, що визначення рівня гормонів до операції може допомогти для подальшого прогнозу успішності та ефективності TESE, оскільки диференціація між цими двома етіологіями є надзвичайно важливою та залежить від ретельного анамнезу та фізичного обстеження та рекомендованого лабораторного/генетичного тестування. NOA є результатом або первинної тестикулярної недостатності (підвищення ЛГ, ФСГ), малі яєчка, що вражають до 10% чоловіків із безпліддям), або вторинної тестикулярної недостатності (вроджений гіпогонадотропний гіпогонадизм зі зниженням ЛГ і ФСГ, малі яєчка) або неповна тестикулярна недостатність (підвищений ФСГ і нормальний об'єм яєчок, нормальний ФСГ і малі яєчка або нормальний ФСГ і нормальний об'єм яєчок).

Сироватковий тестостерон, ЛГ, ФСГ і пролактин можуть розрізнити NOA і OA. Тим не менш, частота вилучення сперматозоїдів у чоловіків з NOA після TESE залишається лише 50%, що призводить до значної кількості невдалих операцій TESE. З огляду на те, що TESE пов'язаний з кількома

побічними ефектами, прогнозування результату TESE до операції може скасувати непотрібні операції та, таким чином, запобігти несприятливим побічним ефектам у пацієнтів з NOA. Оскільки процес сперматогенезу регулюється гормонами, гормональний профіль сироватки та насінної плазми може містити корисну інформацію про стан сперматогенезу та потенційно може передбачити ймовірність отримання сперматозоїдів у пацієнтів з NOA. Існує багато літератури про передбачувану здатність гормонів.

У таблиці 3.1. наведено узагальнюючі дані показників рівнів гормонів, отриманих у чоловіків перед TESE, жінки яких потім завагітніли та не завагітніли при заплідненні сперматозоїдами, отриманих за методом TESE.

Аналіз отриманих результатів свідчить про достовірні зміни гормонів у чоловіків, зокрема гонадотропінів ЛГ, ФСГ та інгібіну В, що синтезується клітинами Сертолі, жінки яких завагітніли при заплідненні сперматозоїдами, отриманих за методом TESE (табл.3.1).

Таблиця 3.1.

Показники рівнів гормонів у чоловіків перед TESE, жінки яких завагітніли та не завагітніли

Гормон	Вагітні	Невагітні	Референтні значення
ЛГ (мМО/мл)	4,48 ± 0,59 *	6,93 ± 0,98	1,5-9,3
ФСГ(мМО/мл)	5,73 ± 0,70 *	12,54 ± 2,13	0,7-14,9
Пролактин (нг/мл)	7,69 ± 0,48	7,88 ± 0,56	2,1-17,7
Естрадіол (пг/мл)	24,44 ± 2,14	29,27 ± 2,63	<56
Тестостерон загальний (нмоль/л)	15,41 ± 1,40	17,09 ± 2,12	5,72-26,14
Інгібін В (пг/мл)	159,50 ± 10,80 *	95,22 ± 13,27	25,0-325,0

* - * – різниця між групами вагітні і невагітні вірогідна при $p \leq 0,05$

Відповідно до завдання кваліфікаційної роботи ми ретельно проаналізували статистично значущу різницю у рівні гонадотропінів між 2 незалежними групами вагітних та невагітних жінок.

Отримані дані ми пояснюємо тим, що ФСГ вважається одним з найбільш предикативних маркерів для визначення шансів отримання сперматозоїдів під час TESE, а також аби відрізнити OA та NOA.

Кілька досліджень показали, що середній рівень сироваткового ФСГ був значно нижчим у пацієнтів з NOA з успішним результатом TESE, ніж у пацієнтів з невдалим результатом (Bernie et al., 2013; Ramasamy et al., 2009).

У нашому дослідженні спостерігалась така сама тенденція, адже рівень ФСГ у чоловіків до TESE був нижчим, і жінки цих чоловіків завагітніли, отже, можна було припустити, що рівень ФСГ відображає кореляцію з вищим рівнем бластуляції ембріонів та подальшим збільшенням частоти настання вагітності та народження здорової дитини, але після проведення кореляційного аналізу, зв'язку не було знайдено ($p > 0.05$, $p = 0,94$), (рис.3.1.).

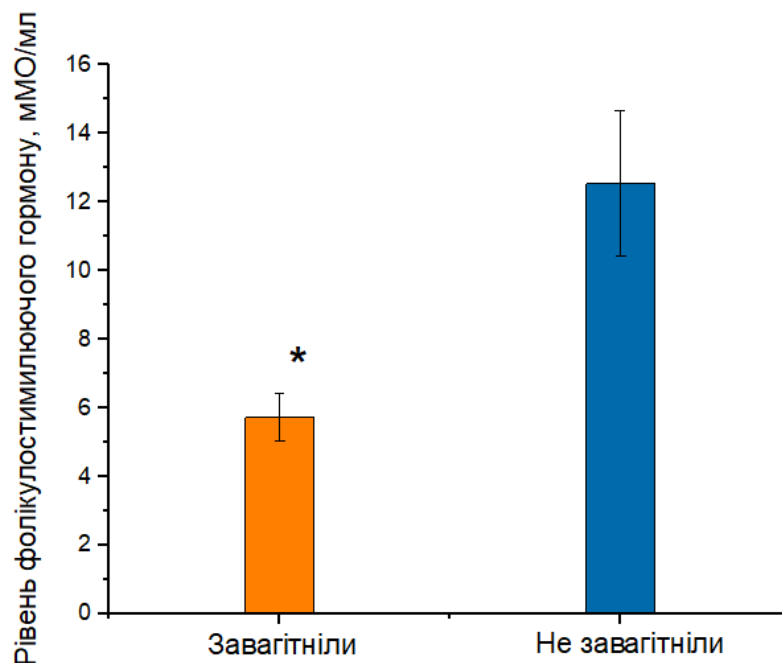


Рис. 3.1. Рівень ФСГ у чоловіків перед TESE, жінки яких завагітніли та не завагітніли після запліднення сперматозоїдами, отриманих методом TESE

* – різниця між групами вірогідна при $p \leq 0,05$

У нашій роботі граничним значенням норми для сироваткового ФСГ було 16,9 мМО/мл серед групи вагітних після TESE. Подібним чином Bonarriba et al. ввели граничну точку 12,2 мМО/мл для сироваткового ФСГ (Bonarriba et al., 2013). Тим не менш, загально визнано, що сироватковий ФСГ має низьку цінність для прогнозування наявності сперматозоїдів в яєчках.

Дійсно, у попередніх дослідженнях спостерігалися випадки навіть із сироватковим ФСГ > 90 мМО/мл, але позитивними результатами TESE (Ramasamy et al., 2009). Підтвержуючи останнє твердження, недавній мета-аналіз, в якому оцінено загалом 1261 особу з NOA, з'ясував, що сироватковий ФСГ є поганим предиктором успішного відновлення сперматозоїдів за допомогою mTESE (Li et al., 2018).

Ці суперечки щодо прогностичної цінності ФСГ можуть бути частково виправдані тим фактом, що концентрація ФСГ у сироватці крові корелює з кількістю зародкових клітин у яєчках, але не з кількістю диференційованих сперматозоїдів.

Окрім того, сироватковий рівень ФСГ є лише репрезентативним показником загальної функції сперматогенезу і не може виявити вогнища існування сперматозоїдів у сім'яних канальцях яєчка.

Отже, з огляду на той факт, що mTESE, яка забезпечує точне обстеження сім'яних канальців для виявлення плям з активним сперматогенезом, можливість отримання спермаозоїдів все ще існує у чоловіків з підвищеним рівнем сироваткового ФСГ (Bernie et al., 2013; Ramasamy et al., 2009).

Загалом, хоча нижчі рівні сироваткового ФСГ корелюють із вищим SRR за допомогою процедури TESE, вищі значення не усувають шансів на успішне вилучення сперматозоїдів, особливо за допомогою техніки mTESE.

Отже, сироватковий FSH не є придатним біомаркером для скасування процедури TESE. Результати достовірного зниження рівня ФСГ у чоловіків сприяють настанню вагітності у жінок при заплідненні сперматозоїдами, отриманими за методом TESE.

3.2. Результати показників рівня ЛГ у чоловіків як біомаркеру TESE

Аналіз даних стосовно гонадотропіну ЛГ, який синтезується у лютропоцитами аденогіпофіза і дії на клітинах Лейдіга, стимулюючи стероїдогенез, показав є статистична різниця між показниками ЛГ двох груп.

У нашому дослідженні було виявлено, що рівень ЛГ у чоловіків до TESE був нижчим і жінки таких пацієнтів-чоловіків завагітніли при заплідненні сперматозоїдами, отриманими методом TESE.

Отже, можна було припустити, що рівень ЛГ відображає кореляцію з вищим рівнем бластуляції ембріонів та подальшою вищою частотою настання вагітності та народженням здорової дитини, але після проведення кореляційного аналізу, зв'язку не було знайдено ($p > 0.05$, $p = 0,85$), (рис. 3.2).

У нашій роботі граничним значенням норми для сироваткового ЛГ було 11,4 мМО/мл серед групи вагітних після TESE.

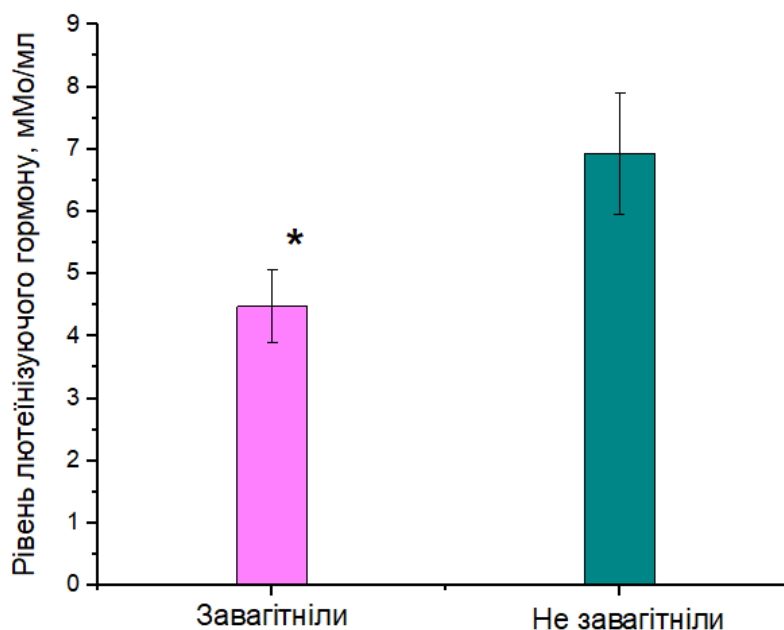


Рис. 3.2. Рівень ЛГ у чоловіків перед TESE, жінки яких завагітніли та не завагітніли після запліднення сперматозоїдами, отриманих методом TESE.

* – різниця між групами вірогідна при $p \leq 0,05$

Більшість робіт, які досліджували концентрацію ЛГ у сироватці крові з результатом TESE, не виявили істотної різниці в рівнях ЛГ між пацієнтами з успішним результатом TESE та без нього, і, отже, не враховували жодної прогностичної цінності для рівня ЛГ у сироватці.

Навпаки, Cetinkaya et al. повідомили про значно нижчі рівні сироваткового ЛГ у чоловіків із позитивним SRR порівняно з негативним (Cetinkaya et al., 2008). Вони також визначили 7,5 мМО/мл як граничну точку для сироваткового ЛГ і представили ЛГ як один із позитивних прогностичних біомаркерів для успішної TESE. У літературі існує консенсус щодо того, що частота вилучення сперматозоїдів за допомогою процедури TESE не є точно передбачуваною на основі рівня ЛГ у сироватці крові.

Можна зазначити, що отримані дані, що достовірно зниження рівня ЛГ у чоловіків сприяє вагітності у жінок при заплідненні сперматозоїдами, отриманими за методом TESE.

3.3. Зміни рівня інгібіну В як непрямого маркера сперматогенезу

Відповідно до завдання роботи ми також порівнювали, чи є статистична різниця при порівнянні рівня інгібіну В, який синтезується клітинами Сертолі звивистих сім'яних канальців яєчка.

У нашому дослідженні було виявлено, що рівень інгібіну В у чоловіків до TESE був вищим, і жінки цих чоловіків завагітніли при заплідненні сперматозоїдами, отриманих за методом TESE.

Отже, можна було припустити, що рівень інгібіну В відображає кореляцію з вищим рівнем бластуляції ембріонів та подальшою вищою частотою настання вагітності та народженням здорової дитини, але після проведення кореляційного аналізу, зв'язку не було знайдено ($p > 0.05$, $r = 0,54$), рис.3.3.).

У нашій роботі граничним мінімальним значенням норми для сироваткового інгібіну В було 64,8 пг/мл серед групи вагітних після TESE.

Відомо, що через переважну секрецію інгібіну В з апікального полюса клітин Сертолі до сім'яних каналців його рівень у сім'яній плазмі може бути приблизно в 10 разів вищим, ніж у сироватці.

Було виявлено, що рівні інгібіну В у сироватці крові значно нижчі у чоловіків із тестикулярною дисфункцією порівняно з контрольною групою, а також позитивно корелюють із класичними маркерами сперматогенезу, такими як концентрація сперматозоїдів, загальна кількість сперматозоїдів та об'єм ячок. Пригнічення сперматогенезу, викликане екзогенним тестостероном або хіміотерапією, супроводжується зниженням рівня інгібіну-В у сироватці крові (Tunc et al., 2006).

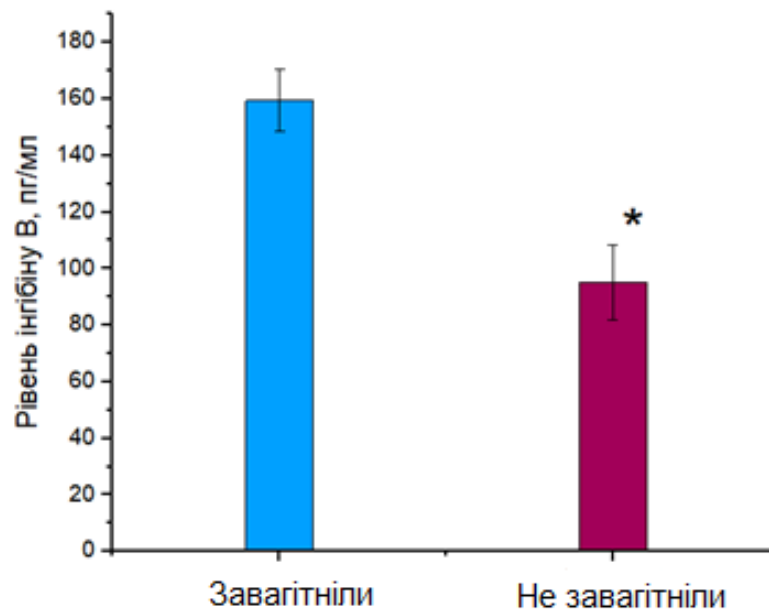


Рис. 3.3. Рівень інгібіну В у чоловіків перед TESE, жінки яких завагітніли та не завагітніли після запліднення сперматозоїдами, отриманих методом TESE.

* – різниця між групами вірогідна при $p \leq 0,05$

Отже, підвищений рівень інгібіну В сприяв отриманню вагітності жінок при заплідненні сперматозоїдами, отриманими за методом TESE і його можна вважати одним з найголовніших предикативних факторів подальшого настання вагітності після запліднення сперматозоїдами, отриманих шляхом TESE.

3.4. Дослідження рівня гормонів, які не вплинули на успішність TESE

У нашому дослідженні рівні пролактину серед чоловіків, у яких жінки в майбутньому завагітніли та не завагітніли при заплідненні сперматозоїдами, отриманих за методом TESE, не відрізнялися ($7,69 \pm 0,48$ та $7,88 \pm 0,56$ відповідно). Також, незважаючи на наявність азооспермії, рівень пролактину в середньому не виходив за межі норми.

Підвищений рівень сироваткового пролактину пригнічує пульсуюче вивільнення GnRH з передньої частки гіпофіза та пригнічує як ФСГ, так і ЛГ.

Нормальний діапазон сироваткового ПРЛ у дорослих чоловіків становить менше 15 нг/мл. Було виявлено, що у пацієнтів з азооспермією рівень ПРЛ у сироватці крові вищий. Сироваткові рівні ПРЛ у пацієнтів з НОА (10,3 мМО/л, n = 54) були вищими, ніж у пацієнтів з ОА (6,9 мМО/л, n=97), але це не було сильним маркером для відрізнити НОА від ОА.

Отже, очевидно, що сироватковий пролактин не має будь-яких прогнозних зауважень щодо ймовірності відновлення сперми за допомогою процедури TESE (Zarezadeh et al., 2021), (Тао, 2022).

У нашому дослідженні рівні тестостерону серед чоловіків, у яких жінки в майбутньому завагітніли та не завагітніли при заплідненні сперматозоїдами, отриманих за методом TESE, не відрізнялися ($15,41 \pm 1,40$ та $17,09 \pm 2,12$ відповідно). Також, незважаючи на наявність азооспермії, рівень тестостерону в середньому не виходив за межі норми.

Але в інших роботах було виявлено значно вищі рівні як загального, так і вільного тестостерону у сироватці пацієнтів з NOA з успішним вилученням сперматозоїдів. Більше того, у звітах, які пропонують тестостерон як прогностичний біомаркер, рівень тестостерону в сироватці або діє як частина багатовимірної моделі, або не має достатньої чутливості та специфічності, необхідних для клінічного застосування. Отже, рівень тестостерону в сироватці крові не є відповідним ознакою вилучення сперми перед операцією TESE (Zarezadeh et al., 2021), (Majzoub et al., 2021).

У нашому дослідженні рівні естрадіолу серед чоловіків, у яких жінки в майбутньому завагітніли та не завагітніли при заплідненні сперматозоїдами, отриманих за методом TESE, не відрізнялися ($24,44 \pm 2,14$ та $29,27 \pm 2,63$ відповідно). Також, незважаючи на наявність азооспермії, рівень естрадіолу в середньому не виходив за межі норми.

Існує відносно небагато досліджень, які вивчали рівень естрадіолу в сироватці крові щодо успішного вилучення сперматозоїдів під час процедури TESE, і більшість із них виявили, що позитивні та негативні групи порівнюються за концентрацією естрадіолу в сироватці. Дослідники не спостерігали статистичної різниці рівнів естрадіолу в сироватці між успішними та невдалими групами вилучення сперматозоїдів у чоловіків з NOA (Zarezadeh et al., 2021).

3.5. Результати ІКСІ та частота бластуляції у різних групах обстежених

За даними спеціальної літератури загалом не спостерігалось відмінностей щодо частоти запліднення, імплантації та клінічної вагітності щодо методів, які використовуються для NOA. Але цикли ІКСІ з тестикулярними сперматозоїдами є менш успішними при NOA порівняно з ОА. Крім того, при використанні тестикулярних сперматозоїдів не було

помічено відмінностей у заплідненні або клінічних показниках вагітності після кріоконсервації.

Отже, результати ICSI у пар з азооспермією, які вимагали вилучення сперматозоїдів з яєчок, вказують на те, що джерело сперматозоїдів мало впливало на прогноз.

У нашому дослідженні після отримання сперматозоїдів за допомогою TESE та проведення ІКСІ отримували високі показники бластуляції ембріонів (рис. 3.4).

У жінок, які пізніше завагітніли середнє значення частоти бластуляції сягнуло $0,54 \pm 0,05$, а тих, хто не завагітнів – $0,36 \pm 0,06$.

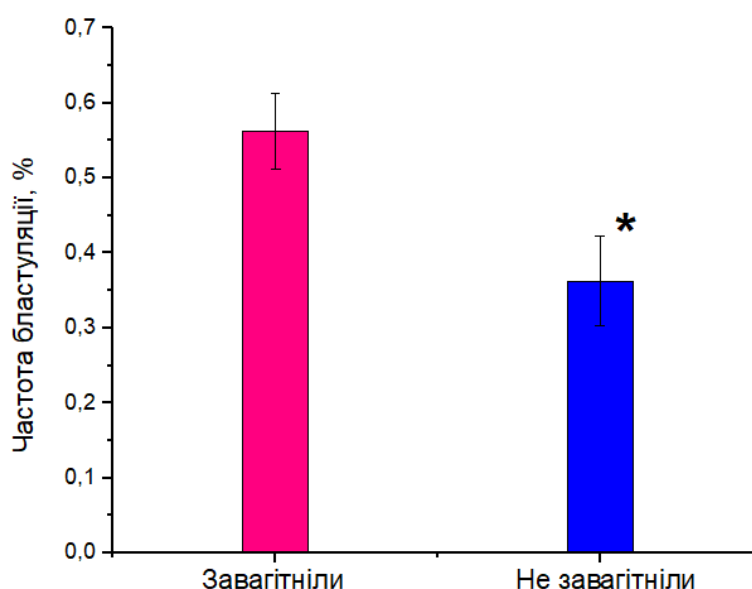


Рис. 3.4. Частота бластуляції у пацієток, які завагітніли та не завагітніли, після запліднення сперматозоїдами, отриманих методом TESE.

* – різниця між групами вірогідна при $p \leq 0,05$

Хоча ймовірність успішного вилучення сперматозоїдів у чоловіків з ОА наближається до $>90\%$, шанси на вилучення сперматозоїдів з NOA не такі високі. TESA, TESE успішні у 20-45% чоловіків з NOA. При micro-TESE шанс успішного вилучення може досягати 63%.

Часто після TESE ми отримуємо живі, але нерухливі сперматозоїди, тому для їх активації необхідні спеціальні речовини, а саме метилксантини, наприклад, пентоксифілін, теофілін та кофеїн є неселективними інгібіторами фосфодіестерази та використовуються для підвищення рухливості сперматозоїдів. Було проведено ряд досліджень (Sharpe et al., 2020), в яких було показано, що метилксантини покращують рухливість через цАМФ-опосередкований сигнальний каскад реакцій. Фосфодіестераза є ензимом, що перетворює циклічний аденозинмонофосфат (цАМФ) в аденозинмонофосфат (АМФ). Внаслідок блокування перетворення цАМФ в АМФ, в цитоплазмі зростає концентрація цАМФ, який активує протеїнову кіназу А та наступне фосфорилування й полегшення метаболічних процесів, як гліколіз та цикл трикарбонових кислот для вироблення енергії, щоб забезпечити рух сперматозоїда.

Одним із завдань даної роботи було порівняти частоту бластуляції при заплідненні сперматозоїдами з нативної біопсійної тканини, тобто в той же день, коли вони були отримані, з кріоконсервованими сперматозоїдами, які використовувались після відтаювання.

Більшість кейсів запліднення були саме з кріоконсервованими сперматозоїдами, адже досить складно знати наперед на 100%, чи ми отримаємо чоловічі статеві клітини, тому TESE у чоловіка та оваріальна пункція у дружини часто проходять в різні місяці. Можна зазначити, що при достатній кількості отриманих під час TESE сперматозоїдів, не має бути проблеми при заплідненні їх методом ІКСІ. Але досить часто при необструктивній азооспермії, коли кількість отриманих сперматозоїдів дуже низька, частина може загинути при розморозці або «загубитися» при центрифугуванні, що ускладнює пошуки гамет та потребує більше часу та зусиль для ембріолога для виконання такого ІКСІ.

Отже, як видно з графіка (рис. 3.5) різниця у бластуляції не є значущою при використанні кріоконсервованих ($0,45 \pm 0,05$) та нативних ($0,50 \pm 0,06$) сперматозоїдів ($p \leq 0,05$), отриманих за методом TESE. Але частота

бластуляції має тенденцію до збільшення саме після використання нативних сперматозоїдів, що може бути пов'язане з їхньою більшою концентрацією, життєздатністю та відсутності дії процесу заморозки.

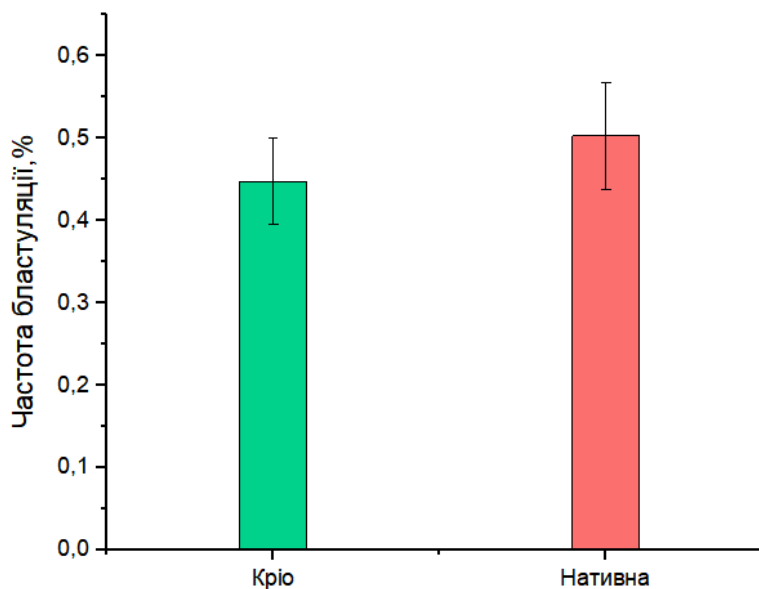


Рис. 3.5. Частота бластуляції при заплідненні нативними та кріоконсервованими сперматозоїдами, отриманих методом TESE.

Також нами був проведений аналіз, в якому ми порівняли, чи збільшується частота настання вагітності при заплідненні кріоконсервованими чи нативними сперматозоїдами, отриманих методом TESE.

При проведенні статистичного аналізу Т-критерію Стюдента для якісних даних ми також не побачили значущою різниці ($p \leq 0.05$).

На підставі отриманих нами результатів ми плануємо у майбутньому вдосконалити методику кріоконсервування сперматозоїдів, отриманих після TESE, адже використовуючи звичайне повільне заморожування, як для сперми, може бути не дуже ефективним при заморозці одиничних сперматозоїдів. Також цю методику можна використовувати за необхідності

заморожування дуже низької концентрації сперматозоїдів з еякуляту, наприклад, при наявності криптозооспермії.

Ефективне кріоконсервування низької кількості сперматозоїдів дозволяє проводити ICSI багато разів, адже ці мінімальні дози можна розділити на багато спроб, тим самим зменшивши кількість хірургічних втручань для пацієнтів, що може бути ризикованим при частих спробах (Zhang et al., 2021).

У наукових працях було описано численні методики для заморожування одиничних сперматозоїдів, а також невеликих аліквот, що містять від 10 до 100 сперматозоїдів. Для цього використовувались «пусті» zona pellicida або мікрокраплі поживного середовища, в які занурювали сперматозоїди, але ці методи виявились не дуже ефективними. А, отже, найдієвішим наразі методом є вітрифікація сперматозоїдів (рис. 3.6) на sperm vitrification device (Montag & Morbeck, 2017).



Рис. 3.6. Девайс для вітрифікації одиничних сперматозоїдів, Sperm VD, Gynemed.

Але в нашій роботі були пацієнти з NOA, у яких отримували дуже мало сперматозоїдів після TESE, і, на жаль, після кріоконсервування та відтаювання сперматозоїди втрачали свою рухливість, тому пентоксифілін значно покращує процес ІКСІ. При такому ІКСІ необхідними є правильна відмивка

сперматозоїдів, яких може бути всього не більше 10, адже знайти їх в осаді займає багато часу.

Пентоксифілін, ймовірно, відіграє роль в зниженні кількості активних форм кисню, включаючи супероксид аніони, а також інгібує фактор некрозу пухлин альфа (TNF- α), що покращує цілісність ДНК та пригнічує апоптоз. Але спостерігається тенденція, що пентоксифілін покращує показники рухливості сперматозоїдів, але його дія на нормальні сперматозоїди може порушити цілісність ДНК, тому не завжди його використання є доцільним (Kovačič et al., 2006).

В експериментах, в яких проводили ICSI нерухомими сперматозоїдами, частота запліднення та настання вагітності були зниженими. Також необхідно відмітити, що похідні ксантину повинні якомога менше контактувати з ембріонами, оскільки навіть короткий вплив пентоксифіліну на ооцит може призвести до морфологічних змін.

Відповідно до мети і завдань даної роботи ми також порівняли частоту бластуляції при заплідненні сперматозоїдами, отриманих методом TESE. ооцитів пацієток та донорських ооцитів.

Більшість кейсів запліднення були саме з використанням ооцитів пацієток, адже частіше за все, коли в парі чоловік має азооспермію, тобто повну відсутність сперматозоїдів в еякуляті, то його дружина є здоровою та має адекватний оваріальний резерв, тому пара не має потреби у використанні донорських ооцитів, які в основному використовуються після заморожування, і їхня якість може трохи погіршуватися.

Отже, на підставі розрахунків як наведено на рис. 3.7. різниця між частотою бластуляції при заплідненні пацієтських ($0,47 \pm 0,06$) та донорських ($0,45 \pm 0,06$) ооцитів не є значущою.

Також нами був проведений аналіз, в якому ми порівняли, чи збільшується частота настання вагітності при пацієтських чи донорських ооцитів сперматозоїдами після TESE. При проведенні Т-критерію Стюдента для якісних даних ми також не отримали значущою різниці ($p \leq 0.05$).

Але порівнювати різницю між двома групами ооцитів є складніше, адже враховується вік пацієнтки та донора, чи ооцити нативні чи кріоконсервовані, наскільки вони гарної якості.

Шанси на підвищення показників запліднення, бластуляції має допоміжна активація ооцитів (ДАО).

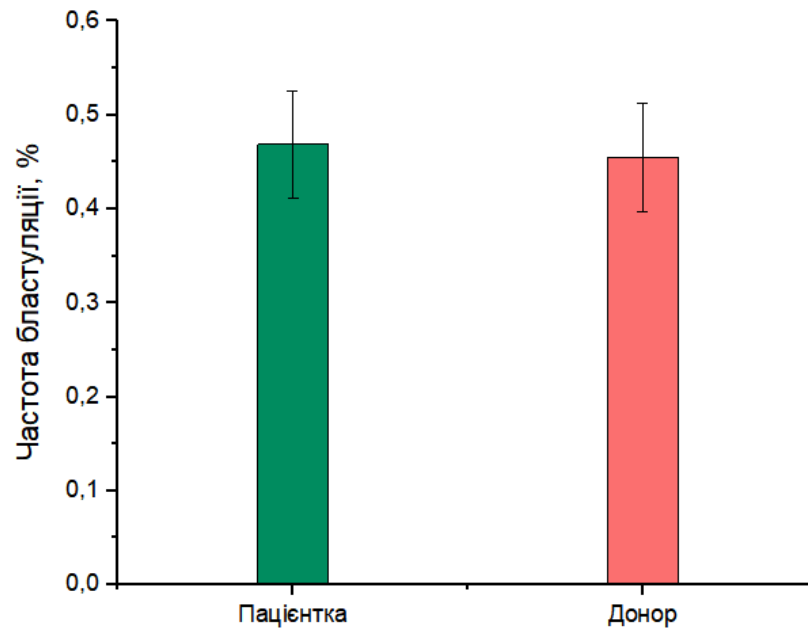


Рис. 3.7. Частота бластуляції при заплідненні донорських та ооцитів пацієнток сперматозоїдами, отриманих методом TESE.

За даними літератури допоміжна активація ооцитів (ДАО) базується на наступних теоретичних та експериментальних дослідженнях.

Зокрема деякі дослідження показали, що дефіцит або недостатність сигналу кальцію (Ca^{2+}) під час активації ооцитів пов'язаний із зупинкою ембріона, аномаліями дроблення чи поганою якістю бластоцисти.

Під час запліднення ссавців сперматозоїди вивільняють специфічну для сперматозоїдів фосфоліпазу C zeta (PLC ζ) в ооплазму відразу після злиття плазматичних мембран сперматозоїдів і ооцитів, а потім призводять до коливань Ca^{2+} , які є важливими для нормального запліднення та початку ембріогенезу. Цей процес відомий як активація ооцитів (Kashir et al., 2010).

Послідовність клітинних подій під час активації ооцитів, включаючи рекрутинг материнської мРНК, перебудову цитоскелету, активацію ембріонального геному та ініціацію дроблення, є передумовою переходу ооцита до раннього ембріонального розвитку і залежить від різної кількості осциляцій Ca^{2+} . Загалом збільшення Ca^{2+} під час активації пізніше впливає на подальший ембріональний розвиток і, навпаки, збій активації ооцитів внаслідок недостатності кальцію, пов'язаної зі сперматозоїдами або ооцитами, може призвести до поганого розвитку ембріона (Murugesu et al., 2017).

ДАО, включаючи механічні, електричні та хімічні стимули, розглядається як можливий підхід, який може збільшити Ca^{2+} в ооцитах і ефективно індукувати активацію ооцитів. Кальцієві іонофори, включаючи іономіцин і кальціміцин (A23187), є найпоширенішими підходами, що використовуються в ДРТ, і широко використовуються для порятунку невдалого запліднення.

У нашій клініці IVMED ми здійснюємо ДАО при заплідненні тестикулярними сперматозоїдами таким способом: ми використовуємо 10 мкл з мікропробірки на 990 мкл безбілкового середовища з HEPES, ДАО виконується протягом 15 хвилин після 15 хвилин ICSI, а потім тричі промиваємо.

Окрім того, сучасні іонофори, що використовуються в ооцитах людини, можуть викликати лише одиничний транзиторний Ca^{2+} шок, на відміну від коливань Ca^{2+} у фізіологічному стані, але їх переваги все одно є значними.

На підставі вище зазначеного можна зробити підсумки, що кріоконсервація сперматозоїдів, отриманих методом TESE, не впливає на частоту бластуляції ембріонів та настання вагітності.

При цьому частота бластуляції між донорськими та ооцитами пацієнок, запліднених сперматозоїдами за TESE, суттєво не відрізняється відповідно до віку жінки, кількостю та кріотолерантністю ооцитів.

ВИСНОВКИ

1. При проведенні ІКСІ нами одержано високі показники бластуляції ембріонів при заплідненні ооцитів жінок сперматозоїдами, отриманих за допомогою методу TESE у чоловіків з азооспермією.

2. Кріоконсервація сперматозоїдів, отриманих методом TESE, не впливає на частоту бластуляції ембріонів та настання вагітності у жінок.

3. Частота бластуляції між донорськими та ооцитами пацієнок при заплідненні сперматозоїдами, отриманих за допомогою TESE, не має достовірних відмінностей.

4. Нами отримано позитивні результати показників вагітності жінок при заплідненні сперматозоїдами, отриманих методом TESE, порівняно з не вагітними жінками при достовірних змінах рівней ФСГ, ЛГ та інгібіну В на тлі інших гормонів у чоловіків.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Antinori, S., Versaci, C., Dani, G., Antinori, M., Pozza, D., & Selman, H. A. (1997). Fertilization with human testicular spermatids: Four successful pregnancies. *Human Reproduction*, 12(2), pp. 233-237.
2. Bernie, A. M., Ramasamy, R., & Schlegel, P. N. (2013). Predictive factors of successful microdissection testicular sperm extraction. In *Basic and Clinical Andrology*, 23(1), pp. 1064-1074.
3. Bonarriba, C. R., Burgués, J. P., Vidaña, V., Ruiz, X., & Pizá, P. (2013). Factores predictivos de recuperación espermática en las azoospermias. *Actas Urologicas Espanolas*, 37(5), pp. 261-268.
4. Caroppo, E., & Colpi, G. M. (2021). Hormonal treatment of men with nonobstructive azoospermia: What does the evidence suggest? In *Journal of Clinical Medicine*, 10(3), pp. 15-21.
5. Cetinkaya, M., Alici, B., Akkus, E., Hattat, H., Oner, A., & Ozkara, H. (2008). Prediction of successful outcome of microdissection testicular sperm extraction in men with idiopathic nonobstructive azoospermia. *Journal of Urology*, 179(4), pp. 151-158.
6. Cioppi, F., Rosta, V., & Krausz, C. (2021). Genetics of azoospermia. In *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), pp. 1331-6.
7. Corona, G., Minhas, S., Giwercman, A., Bettocchi, C., Dinkelman-Smit, M., Dohle, G., Fusco, F., Kadioglou, A., Kliesch, S., Kopa, Z., Krausz, C., Pelliccione, F., Pizzocaro, A., Rassweiler, J., Verze, P., Vignozzi, L., Weidner, W., Maggi, M., & Sofikitis, N. (2019). Sperm recovery and ICSI outcomes in men with non-obstructive azoospermia: A systematic review and meta-analysis. In *Human Reproduction Update*, 25(6), pp. 283-288.
8. Deruyver, Y., Vanderschueren, D., & Van der Aa, F-. (2014). Outcome of microdissection TESE compared with conventional TESE in non-obstructive azoospermia: A systematic review. In *Andrology*, 2(1), pp. 1-15.
9. Donoso, P., Tournaye, H., & Devroey, P. (2007). Which is the best

sperm retrieval technique for non-obstructive azoospermia? A systematic review. In *Human Reproduction Update*, 13(6), pp. 2179-2188.

10. Duvilla, E., Lejeune, H., Trombert-Paviot, B., Gentil-Perret, A., Tostain, J., & Levy, R. (2008). Significance of inhibin B and anti-Müllerian hormone in seminal plasma: a preliminary study. *Fertility and Sterility*, 89(2), pp. 39-47.

11. Hauser, R., Yogev, L., Paz, G., Yavetz, H., Azem, F., Lessing, J. B., & Botchan, A. (2006). Comparison of efficacy of two techniques for testicular sperm retrieval in nonobstructive azoospermia: Multifocal testicular sperm extraction versus multifocal testicular sperm aspiration. *Journal of Andrology*, 27(1), pp.28-35.

12. Haydardedeoglu, B., Turunc, T., Kilicdag, E. B., Gul, U., & Bagis, T. (2010). The Effect of Prior Varicocelelectomy in Patients With Nonobstructive Azoospermia on Intracytoplasmic Sperm Injection Outcomes: A Retrospective Pilot Study. *Urology*, 75(1), pp.79-85.

13. Herndon, C. C., Godart, E. S., & Turek, P. J. (2022). Testosterone levels among non-obstructive azoospermic patients 2 years after failed bilateral microdissection testicular sperm extraction: a nested case-cohort study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 39(6), pp.123-129.

14. Ishikawa, T. (2012). Surgical recovery of sperm in non-obstructive azoospermia. In *Asian Journal of Andrology*, 14(1), pp.88-97.

15. Jahromi, B. N., Zeyghami, S., Parsanezhad, M. E., Ghaemmaghani, P., Zarei, A., Kutenae, M. A., Sohail, P., & Keshavarz, P. (2020). Determining an optimal cut-off value for follicle-stimulating hormone to predict microsurgical testicular sperm extraction outcome in patients with non-obstructive azoospermia. *Archives of Endocrinology and Metabolism*, 64(2), pp.349-359.

16. Josso, N., Rey, R. A., & Picard, J. Y. (2013). Anti-Müllerian hormone: A valuable addition to the toolbox of the pediatric endocrinologist. In *International Journal of Endocrinology*, 12(8), pp. 1305-1320.

17. Kashir, J., Heindryckx, B., Jones, C., de Sutter, P., Parrington, J., & Coward, K. (2010). Oocyte activation, phospholipase C zeta and human infertility. *Human Reproduction Update*, 16(6), pp. 2408-2415.
18. Khampang, S., Cho, I. K., Punyawai, K., Gill, B., Langmo, J. N., Nath, S., Greeson, K. W., Symosko, K. M., Fowler, K. L., Tian, S., Statz, J. P., Steves, A. N., Parnpai, R., White, M. A., Hennebold, J. D., Orwig, K. E., Simerly, C. R., Schatten, G., & Easley, C. A. (2021). Blastocyst development after fertilization with in vitro spermatids derived from nonhuman primate embryonic stem cells. *F and S Science*, 2(4), pp. 111-124.
19. Li, H., Chen, L. P., Yang, J., Li, M. C., Chen, R. B., Lan, R. Z., Wang, S. G., Liu, J. H., & Wang, T. (2018). Predictive value of FSH, testicular volume, and histopathological findings for the sperm retrieval rate of microdissection TESE in nonobstructive azoospermia: A meta-analysis. *Asian Journal of Andrology*, 20(1), pp. 287-294.
20. Majzoub, A., Arafa, M., Khalafalla, K., AlSaid, S., Burjaq, H., Albader, M., Al-Marzooqi, T., Esteves, S. C., & Elbardisi, H. (2021). Predictive model to estimate the chances of successful sperm retrieval by testicular sperm aspiration in patients with nonobstructive azoospermia. *Fertility and Sterility*, 115(2), pp. 331-342.
21. Montag, M., & Morbeck, D. (2017). Principles of IVF laboratory practice: Optimizing performance and outcomes. In *Principles of IVF Laboratory Practice: Optimizing Performance and Outcomes*, 21(3), pp. 1608-25.
22. Murugesu, S., Saso, S., Jones, B. P., Bracewell-Milnes, T., Athanasiou, T., Mania, A., Serhal, P., & Ben-Nagi, J. (2017). Does the use of calcium ionophore during artificial oocyte activation demonstrate an effect on pregnancy rate? A meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 108(3), pp. 2035-41.
23. Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., & Van Steirteghem, A. C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet*, 340(8810), pp.4021-30.

24. Ramasamy, R., Lin, K., Gosden, L. V., Rosenwaks, Z., Palermo, G. D., & Schlegel, P. N. (2009). High serum FSH levels in men with nonobstructive azoospermia does not affect success of microdissection testicular sperm extraction. *Fertility and Sterility*, 92(2), pp. 171-182.
25. Ruwanpura, S. M., McLachlan, R. I., & Meachem, S. J. (2010). Hormonal regulation of male germ cell development. In *Journal of Endocrinology*, 205(2), pp. 215-225.
26. Schiff, J. D., Palermo, G. D., Veeck, L. L., Goldstein, M., Rosenwaks, Z., & Schlegel, P. N. (2005). Success of testicular sperm injection and intracytoplasmic sperm injection in men with Klinefelter syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(11), 104-112.
27. Schoysman, R., Vanderzwalmen, P., Nijs, M., Segal, L., Segal-Bertin, G., Geerts, L., van Roosendaal, E., & Schoysman, D. (1993). Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa. In *The Lancet*, 342 (12), pp. 907-914.
28. Siegel, E. T., Kim, H. G., Nishimoto, H. K., & Layman, L. C. (2013). The molecular basis of impaired follicle-stimulating hormone action: Evidence from human mutations and mouse models. In *Reproductive Sciences*, 20(3), pp. 514-518.
29. Spahovic, H., Göktolga, Ü., Junuzovic, D., Göktaş, C., & Rama, A. (2017). Evaluation of Prognostic Factors and Determinants in Surgical Sperm Retrieval Procedures in Azoospermic Patients. *Medical Archives (Sarajevo, Bosnia and Herzegovina)*, 71(4), pp.100-108.
30. Stouffs, K., Vloeberghs, V., Gheldof, A., Tournaye, H., & Seneca, S. (2017). Are AZFb deletions always incompatible with sperm production? *Andrology*, 5(4), pp. 318-327.
31. Takahashi, C., Morimoto, T., Mizuta, S., Yamaguchi, K., Matsubayashi, H., Kitaya, K., Takeuchi, T., & Ishikawa, T. (2019). Longitudinal analysis of patients who eventually achieved live birth after micro dissection testicular sperm extraction (micro TESE) and ICSI at a single fertility

center. *Human Reproduction*, 34(3), pp. 414-428.

32. Tanaka, A., Suzuki, K., Nagayoshi, M., Tanaka, A., Takemoto, Y., Watanabe, S., Takeda, S., Irahara, M., Kuji, N., Yamagata, Z., & Yanagimachi, R. (2018). Ninety babies born after round spermatid injection into oocytes: survey of their development from fertilization to 2 years of age. *Fertility and Sterility*, 110(3), pp 218-226.

33. Tao, Y. (2022). Endocrine aberrations of human nonobstructive azoospermia. In *Asian Journal of Andrology*, 24(3), pp. 113-124.

34. Tapanainen, J. S., Aittomäki, K., Min, J., Vaskivuo, T., & Huhtaniemi, I. T. (1997). Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nature Genetics*, 15(2), pp.21-40.

35. Tekayev, M., & Vuruskan, A. K. (2021). Clinical values and advances in round spermatid injection (ROSI). In *Reproductive Biology*, 21(3), pp. 45-56.

36. Tunc, L., Kirac, M., Gurocak, S., Yucel, A., Kupeli, B., Alkibay, T., & Bozkirli, I. (2006). Can serum Inhibin B and FSH levels, testicular histology and volume predict the outcome of testicular sperm extraction in patients with non-obstructive azoospermia? *International Urology and Nephrology*, 38 (4), pp. 78-91.

37. Vahidi, S., Narimani, N., Abouei, S., Sadeghi, A., Lorian, K., & Rahavian, A. (2021). Comparison of intracytoplasmic sperm injection outcomes in azoospermic men who underwent testicular sperm extraction vs. Microdissection testicular sperm extraction: A cross-sectional study. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 19(9), pp.651-660.

38. Vloeberghs, V., Verheyen, G., Haentjens, P., Goossens, A., Polyzos, N. P., & Tournaye, H. (2015). How successful is TESE-ICSI in couples with non-obstructive azoospermia? *Human Reproduction*, 30(8), pp. 10-18.

39. Zarezadeh, R., Fattahi, A., Nikanfar, S., Oghbaei, H., Ahmadi, Y., Rastgar Rezaei, Y., Nouri, M., & Dittrich, R. (2021). Hormonal markers as noninvasive predictors of sperm retrieval in non-obstructive azoospermia. In

Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 38(8), pp. 102-110.

40. Zeadna, A., Khateeb, N., Rokach, L., Lior, Y., Har-Vardi, I., Harlev, A., Huleihel, M., Lunenfeld, E., & Levitas, E. (2020). Prediction of sperm extraction in non-obstructive azoospermia patients: A machine-learning perspective. *Human Reproduction*, 35(7), pp. 914-923.

41. Zhang, Z., Jing, J., Luo, L., Li, L., Zhang, H., Xi, Q., & Liu, R. (2021). ICSI outcomes of fresh or cryopreserved spermatozoa from micro-TESE in patients with nonobstructive azoospermia: *Medicine*, 100(12), pp.777-