АНОТАЦІЯ

Воробець М.З. «Клініко-патогенетичні маркери розвитку неплідності чоловіків з азоосперміею» - кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 Медицина. – Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, 2021.

В дисертації викладено результати пошуку прогностичних факторів та аналіз діагностичної цінності результатів вивчення спермограм, повного спекртру соноеластографічних, гормональних, гістологічних, біохімічних і цитогенетичних показників 119 пацієнтів із різними формами азооспермії. Пацієнтів обстежували на базі урологічного відділення КНП ЛОР «Львівська обласна клінічна лікарня» та кафедри урології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

Вік хворих, яким проводили клініко-діагностичні дослідження та біопсію яєчок варіював в межах 22 – 48 років. Середній вік хворих із приводу тестикулярної (секреторної) неплідності складав 28,6 років, а з приводу посттестикулярної (екскреторно-обтураційної) – 31,5 років. Середній термін неплідності складав 4,2 року.

Серед 119 обстежених пацієнтів з азооспермією у 69 (58,0 %) діагностовано секреторну неплідність. У 50 (42,0 %) хворих констатовано збережений сперматогенез при екскреторно-обтураційній неплідності.

Своєю чергою пацієнтів із необструктивною формою було розділено на 4 групи:

Група 1. Секреторно-ендокринна неплідність. Гіпогонадотропний гіпогонадизм (підвищення ФСГ та ЛГ) (n = 23).

Група 2. Секреторно-ендокринна неплідність. Гіпогонадотропний гіпогонадизм (підвищення ФСГ) (n = 19).

Група 3. Секреторно-ендокринна неплідність. Гіпогонадотропний гіпогонадизм (підвищення ЛГ) (n = 4).

Група 4. Секреторна неплідність. Нормогонадотропний гіпогонадизм (n = 23).

Контрольну групу склали 46 практично здорових чоловіків віком від 22 до

45 років, які не мали захворювань, що можуть спричинювати неплідця, а 49 % з них мали дітей. Останнім виконували спермограму, біохімічні дослідження еякуляту та сироватки крові а також соноеластографічні дослідження яєчок.

Обстеження хворих починали зі збору скарг, анамнезу та пальпації органів

калитки і сім'яного канатика. УЗД з ефектом Допплера та якісною компресійною

еластографією органів калитки виконували як комплексне сонологічне обстеження. Аналіз еякуляту проводили згідно зі стандартами оцінки морфологічних характеристик сперми (ВООЗ, 2010). Оцінювали об'єм, абсолютну кількість сперматозоїдів, відсоток прогресивно рухливих, життєздатних і з нормальною морфологією.

Біопсію здебільшого виконували у пацієнтів із попередньо встановленою формою необструктивної азооспермії.

Гормональні дослідження включали вимірювання в сироватці крові концентрації фолікулостимулюючого гормону, лютеїнізуючого гормону, пролактину, естрадіолу, загального тестостерону, інгібіну В.

Біохімічні дослідження включали вивчення активностей та концентрації компонентів про- та антиоксидантної системи (пероксидації ліпідів, концентрації відновленого глутатіону, активностей глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази та глутатіонтрансферази), аргіназа/NO-синтазної системи (активностей аргінази, конститутивної та індуцибельної ізоформ NO-синтази), Ca^{2+}-залежних АТФ-гідролазних систем плазматичної мембрани та ендоплазматичгного ретикулуму.

Оскільки неплідда часто обумовлено структурними перебудовами хромомом, вивчали цитогенетичні зміни хромосом при азооспермії.

На сьогодні проблемою залишається диференційне діагностування різних форм азооспермії, пошук специфічних гормональних, імунологічних, гістологічних, біохімічних чи цитогенетичних маркерів чи показників цього патологічного стану та лікування.

Серед 69 хворих із секреторною формою неплідності з різними формами гіпогонадизму у 23 виявлено азооспермію за відсутності сперматозоїдів і клітин сперматогенезу, що становило 33,3 % усіх пацієнтів із секреторною неплідністю (зокрема, 2 із лейкоцитоспермією, що свідчило про ураження тубулярного апарату внаслідок перенесеного орхіту). У 46 (66,6 %) пацієнтів спостерігалась азооспермія за відсутності сперматозоїдів, однак за наявності клітин попередників сперматогенезу.

У восьми (11,6 %) пацієнтів із 69 діагностовані супутні захворювання. Спостерігались артеріальна гіпертензія, захворювання шлунково-кишкового тракту, печінки, нирок. Спадкових захворювань в обстежених пацієнтів не було виявлено.

За даними УЗД, об’єм яєчок у контрольній групі в середньому складав 22,3 ±2,1 см³, при діапазоні від 18,3 до 25,1 см³. У групі з необструктивною азооспермією об’єм яєчок в середньому складав 16,7±1,7 см³, в діапазоні від 12 до 21,1 см³. У чотирьох чоловіків з нормозооспермією об’єм яєчок був менше 18 см³.

Аналіз різних груп пацієнтів із необструктивгною формою азооспермії показав, що серед 23 чоловіків (група 1) із первинним гіпергонадотропним гіпогонадизмом – 4 (17,5 %) в анамнезі перенесли вірусний орхіт в дитинстві, в одного (4,3 %) відзначений зменшений розмір яєчок в калитці з дитинства після перенесеної операції з приводу флегмони калитки, в одного (4,3 %) відмічена відсутність правого яєчка в калитці, троє (13,0%) хворіли на невірусний орхоепідидиміт. Чотирнадцять інших пацієнтів (60,9 %) будь-які фактори, що б могли негативно вплинути на плідність, заперечують. У всіх 23 пацієнтів яєчка пальпаторно були гіпоплазовані.

Важливе діагностичне значення мають гемодинамічні показники паренхіматозного кровотоку яєчок в інфертильних чоловіків, що отримані за допомогою ультразвукової допплерографії. Середнє значення лінійної швидкості кровотоку (ЛШК) в артеріях паренхіми у чоловіків із нормозооспермією справа складало 0,107±0,015 м/с, а зліва — 0,103±0,012 м/с. При азооспермії середнє значення ЛШК справа складало 0,086±0,012 м/с, а зліва — 0,084±0,008 м/с.

Таким чином, гемодинамічні показники органів калитки свідчать, що найбільш виражені зміни виявлені у чоловіків з азооспермією за відсутності сперматогенезу. Ці показники достовірно відрізняються між собою ($p<0,01$). Всім пацієнтам дослідної групи на основі обстеження, заключення спермограми та гістологічних досліджень біоптатів яєчок було встановлено наявність необструктивної форми азооспермії.

При гістологічному дослідженні тканини яєчка пацієнтів з НОА у всіх зразках виявлено зміни у звивистих сім'яних канальцях. Їх діаметр був у 1,5-2,0 раза меншим (гіпоплазія) щодо норми.

У другій серії досліджень, при аналізі біоптатів 23 пацієнтів із гіпергонадотропним гіпогонадизмом (підвищення ФСГ та ЛГ, група 1), виявлено, що в трьох (13,0 %) чоловіка з вірусним орхітом в анамнезі в гістологічному заключенні зазначено – стінка всіх канальців потовщена та склерозована, їхній просвіт звужений, клітини сперматогенезу та клітини Сертолі відсутні, в інтерстиції – виражений фіброз.

У 20 пацієнтів (87,0 %) гістологічний аналіз виявив, що майже в усіх канальцях наявний лише один клітинний ряд, побудований із витягнутих перпендикулярно до базальної мембрани клітин Сертолі, які розташовані паралельно одна до одної. Просвіт канальців порожній. Лише в поодиноких канальцях наявна невелика кількість герміногенних клітин, представлених здебільшого сперматогоніями.

Подібною гістологічна картина була як у чоловіків після орхопексії, перенесеного вірусного орхіту, хламідійного та бактеріального орхоепідидиміту, так і у чоловіків без обтяженого андрологічного анамнезу.

У групі 2 у чотирьох (21,0 %) пацієнтів з 19 гістологічний аналіз показав, що у канальцях наявна зменшена рядність герміногенних клітин, представлених здебільшого сперматогоніями і сперматоцитами. Зрілих клітин кінцевих стадій сперматогненезу не виявлено. У інших 15 (79,0 %) пацієнтів гістологічна картина практично аналогічна. Майже в усіх канальцях наявний лише один клітинний ряд, побудований із витягнутитх перпендикулярно до базальної мембрани клітин Сертолі. Просвіт канальців порожній і лише в поодиноких канальцях зустрічається невелика кількість герміногенних клітин, представлених здебільшого сперматогоніями. У дев'яти (60,0 %) із вказаних 15 пацієнтів в інтерстиції визначався набряк невеликих груп клітин Лейдіга, а у шести (40,0 %) – стінки деяких канальців були потовщеними та склерозованими, в стромі спостерігався фокальний фіброз.

У чотирьох пацієнтів групи 3 при необтяженому анамнезі та пальпаторно нормальних зовнішніх статевих органах, спостерігалась аплазія герміногенних клітин, у більшості канальців наявний тільки один клітинний ряд, побудований із витягнутих перперндикулярно до базальної мембрани клітин Сертолі, що розташовані паралельно одна до одної. У частині канальців визначаються 1-2 клітинні ряди, в яких переважають клітини Сертолі і виявляється незначна кількість сперматогоній. Просвіт канальців здебільшого порожній. Клітин пізніх стадій сперматогенезу та зрілих сперматозоїдів у просвіті канальців не виявлено.

Серед 23 пацієнтів (група 4) з нормогонадотропним гіпогонадизмом, двоє (8,7 %) до 3-річного віку були оперовані з приводу двобічного крипторхізму, двоє (8,7 %) перенесли операцію Бергмана з однієї сторони, один (4,3 %) – операцію Іванісевича, один (4,3 %) – в неонатальрний період отримував високі дози кортикостероїдів із приводу проблем із диханням, один (4,3 %) – працюваав протягом 2 років перед обстеженням на виробництві зі шкідливими речовинами, інші 16 (69,7 %) пацієнтів андрологічний анамнез заперечують. У восьми (34,8 %) пацієнтів констатовано гіпоплазію яєчок (включно з тими, котрі перенесли орхопексію, орхіт). У 15 (65,2 %) пацієнтів пальпаторно патології зовнішніх статевих органів не виявлено.

Всім 50 пацієнтам зі збереженим сперматогенезом встановлений діагноз «екскреторно-обтураційна неплідність» (обструктивна азооспермія). Серед обстежених у 26 (52,0 %) в ході збору анамнезу вдалось виявити перенесений орхоепідидиміт в анамнезі, один (2,0 %) пацієнт переніс у 5-річному віці двобічну орхопексію з приводу крипторхізму, троє (6,0 %) пригадали травму калитки в анамнезі, решта 20 (40,0 %) будь-які, вражаючі фетильність фактори в анамнезі заперечували.

В групі з діагнозом «екскреторно-обтураційна неплідність» (обструктивна азооспермія) помірна гіпоплазія яєчок (менше 4 см в найбільшому розмірі) спостерігалась у шести (12,0 %) хворих. Також, лише у шести (12,0 %) – пальпувались чоткоподібні ділянки ущільнення на рівні дистальних відділів сім'явивідних проток і вивідної протоки придатків яєчок. В двох (4,0 %) пацієнта, за даними УЗД візуалізувалися сильно кальциновані сім'явивідні протоки (один хворий із підозрою на позалегеневий туберкульоз), у п'яти (10,0 %) пацієнтів не пальпувались дистальні відділи сім'явивідних проток, у інших 31 (62,0 %) пацієнтів при пальпації органів калитки патології не виявлено, навіть після перенесеного в 16-и із них орхоепідидиміту.

Біопсія яєчка є травматичним методом, а отримання зразків тестикулярної тканини є складнішим, ніш отримання сім'яної плазми чи зразків крові для досліджень. Тому, існує потреба в пошуках інших прогностичних показників сперматогенезу.

Оскільки порушення сперматогенезу часто є наслідком відстутності його стимуляції гонадотропінами важливо встановити гормональний статус пацієнта.

Отримані нами дані свідчать, що у 23 пацієнтів (група 1) з первинним гіпергонадотропним гіпогонадизмом рівень ФСГ у крові становить 28,1±3,75 МО/л. У групі 2 (n=19) із секреторно-ендокринною неплідністю (гіпергонадотропний гіпогонадизм, ізольоване підвищення ФСГ) рівень ФСГ у 2 раза нижчий в порівнянні з групою 1 і становить 13,85±0,62 МО/л. У рупі 3 (n = 4) у пацієнтів із секреторно-ендокринною неплідністю (гіпергонадотропний гіпогонадизм, ізольоване підвищення ЛГ) рівень ФСГ нормальний і становить

8,75±0,75 МО/мл. При секреторній неплідності з нормогонадотропним гіпогонадизмом (група 4, n=23) рівень ФСГ становить 6,2±0,5 МО/мл.

Рівень ЛГ у групі 1 при секреторно-ендокринній неплідності (гіпергонадотропний гіпогонадизм, підвищений ФСГ і ЛГ) становить 12,52±1,63 МО/л. В групі 2 при секреторно-ендокринній неплідності (гіпергонадотропний гіпогонадизм, ізольоване підвищення ФСГ) цей показник становить 5,3±0,64 МО/л. В групі 3 при секреторно-ендокринній неплідності (гіпергонадотропний гіпогонадизм, ізольоване підвищення ЛГ) рівень ЛГ дорівнює 8,65±0,15 МО/л. У групі 4, у пацієнтів із секреторною неплідністю при нормогонадотропному гіпогонадизму рівень ЛГ складав 4,8±0,5 МО/мл.

Щодо тестостерону, то в групі 1 його рівень складав 16,13±3,51, в групі 2 – 14,63±4,95, в групі 3 – 11,6±0,4 і в групі 4 – 30,7±7,5 нмоль/л. Лише у трьох (16,7 %) пацієнтів групи 1 спостерігався рівень тестостерону наближений до нижньої межі норми. У п’яти (33,3 %) пацієнтів групи 2 теж спостерігався рівень тестостерону ближчий до нижньої межі норми.

У групі 1 концентрація естрадіолу складала 23,74±6,89, в групі 2 – 40,1± 12,7, в групі 3 – 34,0±1,1, і в групі 4 – 36,8±8,1 пг/мл. Концентрація пролактину в крові пацієнтів групи 1 складала 12,42±2,24, групи 2 – 8,6± 0,4, групи 3 – 3,1±1,3, а групи 4 – 8,3±1,2 нг/мл. В одного (4,3 %) пацієнта із 23 виявилась помірна гіперпролактинемія. Важливою виявилась тенденція до підвищення рівня пролактину в даній групі.

В групі 1 спостерігався сильний кореляційний зв'язок між показниками ФСГ та ЛГ (r = 0,46), ЛГ та загальним тестостероном (r = 0,57), ЛГ та естрадіолом (r = 0,64) (тобто, зі зростанням значення одного показника - зростав і інший).

Сильний обернений кореляційний зв'язок виявили між показниками естрадіолу та пролактину (r =-0,98), естрадіолу та ФСГ (r =-0,87), ЛГ та пролактину (r =-0,53) (тобто, зі зниженням одного показника – зростав інший).

У групі 2 прямий кореляційний зв'язок спостерігався між ФСГ та загальним тестостероном (r = 0,6). Сильний обернений зв'язок між показниками загального тестостерону та естрадіолу (r = -0,77), ФСГ та ЛГ (r = -0,51),

тестостерону та пролактину (r =-0,59), що неможливо однозначно інтерпретувати.

У двох пацієнтів групи 3 спостерігались помірно підвищений ЛГ та нормальні рівні ФСГ, тестостерону, естрадіолу на фоні дещо зниженого пролактину.

У групі 4 залежності між наявністю азооспермії та даними анамнезу чи об'єктивного обстеження не виявлено. Лише в одного (4,3 %) пацієнта концентрація загального тестостерону була ближчою до нижньої межі норми – 6,5 нмоль/л, в іншого (4,3 %) пацієнта концентрація естрадіолу була високою – 91,12 пг/мл. В цій групі кореляційний зв'язок спостерігався між показниками ЛГ та пролактину (r = 0,74). У жодному випадку не спостерігалось гіперпролактинемії.

Таким чином, судячи з наших даних, можна зробити висновок, що в цілому концентрація ФСГ в сироватці крові зворотньо пропорційно корелює з вираженістю порушення сперматогенезу.

При екскреторно-обтураційній неплідності (обструктивна форма азооспермії) рівень ФСГ у крові пацієнтів (n = 50) складав 5,72±1,34 МО/л, рівень ЛГ – 5,29±0,53 МО/л, рівень загального тестостерону – 17,25±2,46 нмоль/л, естрадіолу – 42,42±7,76 пг/мл, а пролактину – 6,0±0,8 нг/мл.

Нами виявлено, що рівень інгібіну В при НОА знижувався в 2,7 раза, в порівнянні з нормозооспермією. Рівень ФСГ має суттєве прогностичне значення, здебільшого при гіпергонадотропному гіпогонадизмі. Оцінка рівня інгібіну В в багатьох випадках може стати альтернативою біопсії для диференційної діагностики неплідця чоловіків.

Згідно сучасних уявлень, розвиток патологічних процесів в організмі супроводжуються порушенням механізмів антиоксидантного захисту клітин [28, 29, 62, 64, 73, 76]. Нами проведено порівняльне дослідження процесів ПОЛ і системи глутатіону в сім'яній плазмі і в сироватці крові чоловіків із азооспермією. Відомо, що окрім ензиматичних компонентів антиоксидантної системи важлива роль належить неензимним антиоксидантам, таким як

глутатіон відновлений, який є центральним компонентом глутатіонової антиоксидантної системи.

Стан неензиматичної компоненти антиоксидантної системи в сім'яній плазмі оцінювали за вмістом відновленого, загального та окисненого глутатіону, та редокс-індексом глутатіону обчисленим за співвідношенням різниці загального та окисненого глутатіону до загального глутатіону.

За результатами дослідження пероксидації ліпідів та окремих компонентів глутатіонової антиоксидантної системи було з'ясовано, що концентрація малонового діальдегіду (МДА), як біомаркера пероксидації ліпідів, у сім'яній плазмі при необструктивній азооспермії зростала в 1,5 раза. Загальна антиоксидантна активність при НОА знижуваласть в 1,5 раза. Концентрація відновленого глутатіону знижувалась в 1,8 раза, а концентрація загального глутатіону знижувалась в 1,5 раза. При цьому достовірних змін в концентрації окисненого глутатіону не виявлено.

Можна вважати, що важливим діагностичним тестом (маркером) на НОА може бути співвідношення відновленого глутатіону до окисненою в спермальній плазмі: при нормозоосперимії – 1,5, а при НОА – 0,9.

Обчислення редокс-індексу (RI GSH) продемонструвало достовірне зниження сумарної потужності даної системи в сім'яній плазмі чоловіків із необструктивною формою азооспермії. Цей показник теж може бути важливим діагностичним тестом на НОА. Різке зниження концентрації відновленого глутатіону і його співвідношення до окисненого глутатіону свідчить про посилене його використання у сім'яній плазмі.

Одночасно з активацією пероксидації ліпідів у сім'яній плазмі пацієнтів з НОА виявлено достовірне зниження активності глутатіонпероксидази щодо контрольних значень, в 1,3 раза. Щодо активності глутатіонредуктази, то достовірних відмінностей між досліджуваною і контрольною групами не виявлено ($p>0,05$).

При дослідженні активності глутатіонтрансферази виявлено, що при необструктивній формі азооспермії її активність достовірно знижується, в 1,2 раза ($p<0,05$).

Аргіназо-NO-синтазна система приймає участь в регуляції практично всіх внутрішньоклітинних процесів, включаючи проліферації та диференціацію клітин. Оксид азоту (NO), що продукується в NO-синтазній реакції регулює процес сперматогенезу, впливає на життєздатність та рухливість сперматозоїдів. В результаті проведених нами експериментів з'ясовано, що при НОА в сім'яній плазмі аргіназна активність є в 1,5 раза нижчою ніж при нормозооспермії ($p<0,05$).

Встановлено, що при НОА активність cNOS достовірно не змінюється щодо контролю ($p>0,05$). Активність iNOS в сім'яній плазмі практично здорових чоловіків ідентифікується в незначній мірі, практично на межі похибки. При НОА активність iNOS, яка є Ca^{2+}-незалежною, зростає щодо контролю в 17,7 раза ($p<0,001$).

Ми вивчали співвідношення активностей аргінази до iNOS. За нормозооспермії воно складає 11,9, а за НОА – 0,5. Таким чином, співвідношення в сім'яній плазмі аргіназа/iNOS може бути важливим прогностичним показником розвитку необструктивної азооспермії. Із цього також випливає, що інгібування iNOS може бути потенційною терапевтичною мішенню при лікуванні азооспермії.

У пацієнтів з азооспермією спостерігалось достовірне зниження в сім'яній плазмі концетрації NO_2^- , у 1,6 раза ($p<0,001$). Щодо NO_3^-, то його концентрація достовірно зростала в 1,5 раза ($p<0,001$). Важливо відмітити, що при азооспермії суттєво зростає співвідношення NO_3^-/NO_2^-, у 4,9 раза. В той час як у нормі це співвідношення дорівнює 2,0 раза. Це співвідношення теж можна вважати прогностичним показником розвитку азооспермії.

Відомо, що не тільки сам оксид азоту, але й його похідні здійснюють важливі фізіологічні функції, беруть участь в регуляції апоптозу, ангіогенезу, вільнорадикальних процесів. Припускається, що NO, що утворюється у надмірній кількості, при патологічних станах організму, має виражену цитотоксичну дію внаслідок утворення пероксинітриту [84, 207, 209].

Окрім оксиду азоту, іонізований Ca^{2+} також відіграє ключову роль в регуляції практично всіх внутрішньоклітиних процесів, включаючи

проліферацію та диференціацію клітин, апоптоз тощо [72, 78, 100, 108]. Важлива роль у підтриманні внутрішньоклітинного гомеостазу Ca^{2+} відводиться Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФазі плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму, функція яких полягає у зниженні концентрації даного іону в цитозолі.

Встановлено, що Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФазна активність плазматичної мембрани лімфоцитів крові практично здорових чоловіків із нормозооспермією достовірно не відрізнялась від фізіологічної норми. При НОА активність цього ензиму знижувалась в 1,5 раза. При дослідженні Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФазної активності мембран ЕПР лімфоцитів крові осіб із ОА та НОА виявлено, що достовірне зниження її спостерігається тільки при НОА ($p<0,05$).

Зниження Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФазної активності плазматичної мембрани і мембран ЕПР лімфоцитів крові пацієнтів з НОА свідчить про зростання $[Ca^{2+}]_i$ у цитозолі лімфоцитів, тобто перевантаження їх іонізованим Ca^{2+}. Зростання концетраці Ca^{2+} в цитозолі свідчить про порушення функціонування регуляторних систем клітини і це характерно для багатьох патологій.

Щодо цитогенетичних змін, то у перших трьох групах пацієнтів генетичних змін при каріотипування не виявлено. У групі 4 з секреторною неплідністю (нормогонадотропний гіпогонадизм) тільки в одного (4,3 %) пацієнта спостерігали каріотип 46 XY, 9ph.

Серед 50 пацієнтів групи зі збереженим сперматогенезом (екскреторно-обтураційна неплідність) лише в одного спостерігався каріотип 46 XY (4) (p152q12). Ще у 4 (8,0 %) пацієнтів виявлено, що вони є гетерозиготами за мутацією F508del гена ТРБМ, що ймовірно стало причиною агенезії ductus deferens. У 45 (90,0 %) пацієнтів із каріотипом 46 XY у досліджуваних ділянках Y-хромосоми мікроделецій не виявлено та аналізованих мутацій гена ТРБМ не виявлено.

Таким чином, в результаті проведених досліджень виявлено, що при необструктивній формі азооспермії відбуваються не тільки морфофункціональні зміни в сім’яниках чи гормональному дзеркалі, але й біохімічні зміни в сім’яній плазмі. Особливо ці зміни проявляються в

порушенні регуляторних систем клітини – про- та антиоксидантної, аргіназо-NO-синтазної та Ca^{2+}-АТФ-залежної. Важливими додатковими прогностичними показниками азооспермії можуть бути зростання в сім'яній плазмі активності індуцибельної ізоформи NO-синтази, співвідношення відновленого глутатіону до окисненого, редокс-індекс відновленого глутатіону, співвідношення активності аргінази до індуцибельної ізоформи NO-синтази, а також співвідношення метаболітів оксиду азоту – NO_3^-/NO_3^-, бальна оцінка гістологічних показників біоптатів яєчок.

Ключові слова: неплідда, азооспермія, секреторно-ендокринна неплідність, екскреторно-обтураційна неплідність, еластографія яєчок, оксидативний стрес, аргіназо-NO-синтазна система, Ca^{2+}-залежна АТФ-гідролазна система, прогностичні маркери азооспермії.

SUMMARY

Vorobets M.Z. Clinical and pathogenetic markers of infertility development in men with azoospermia – qualifying scientific work on the right of manuscript.

Dissertation for the PhD degree (PhD) in specialty 222 Medicine – Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, 2021.

The dissertation is devoted to the study of hormonal, histological, biochemical and cytogenetic indicators that characterize the development of various forms of azoospermia. Azoospermia is the most difficult form of male infertility to treat. It is defined as the complete absence of sperm in the ejaculate. Depending on the nature and causes of impaired spermatogenesis, azoospermia is differentiated into obstructive (excretory, OA) and non-obstructive (secretory, NOA). The issue of the differential diagnosis of various forms of azoospermia, the search for specific hormonal, immunological, histological, biochemical or cytogenetic markers or indicators of this pathological condition and treatment remain unexplored.

The age of patients who underwent clinical diagnostic tests and testicular biopsy varied between 22 and 48 years.The average age of patients with testicular

(secretory) infertility was 28.6 years and with posttesticular (excretory-obstructive) was 31.5 years. The average term of infertility was 4.2 years.

Among 119 examined patients with azoospermia 69 (58.0 %) were diagnosed with testicular infertility. 50 (42,0 %) patients were diagnosed with preserved spermatogenesis at posttesticular infertility.

Among 69 patients with testicular infertility with various forms of hypogonadism 23 were diagnosed with azoospermia at the absence of sperm and spermatogenesis cells. Azoospermia was also observed in 46 (66 %) patients at the absence of spermatozoa but in the presence of spermatogenesis precursor cells.

Eight (11.6 %) patients out of 69 were diagnosed with comorbidities. Hypertension, diseases of the gastrointestinal tract, liver, kidneys were observed. Hereditary diseases in the examined patients were not detected.

According to ultrasound the volume of the testicles in the control group averaged 22.3±2.1 cm^3 in the range from 18.3 to 25.1 cm^3. In the azoospermia group, the average testicular volume was 16.7±1.7 cm, ranging from 12 to 21.1 cm. In four men with normozoospermia testicular volume was less than 18 cm.

Analysis of different groups of patients with non-obstructive azoospermia showed that among 23 men (group 1) with primary hypergonadotropic hypogonadism 4 (17.5 %) had a history of viral orchitis in childhood, one (4.3 %) had reduced testicular size in the scrotum from childhood after undergoing surgery for phlegmon of the scrotum, one (4.3 %) had no right testicle in the scrotum, three (13.0 %) had non-viral orchoepididymitis.

Fourteen other patients (60.9 %) deny any factors that could adversely affect fertility. All 23 patients had testicular palpation hypoplasia (18 to 37 mm).

Hemodynamic parameters of testicular parenchymal blood flow of infertile men obtained by Doppler ultrasound are significant for diagnostic too. The average value of the linear blood flow velocity (LVF) in the arteries of the parenchyma in men with normozoospermia from the right side was 0.107±0.015 m/s and from the left side 0.103±0.012 m/s. At azoospermia, the averrage value of LVF of the right side was 0.086±0.012 m/s and of the left side 0.084±0.008 m/s.

Thus, the hemodynamic parameters of the scrotum indicate that the most pronounced changes were found in men with azoospermia at the absence of spermatogenesis. These indicators differ significantly ($p<0,01$). The presence of a non-obstructive form of azoospermia was established in all patients of the experimental group on the basis of examination and conclusion of the spermogram.

Histological examination of the testicular tissue of patients with NOA in all samples revealed changes in the tortuous seminal tubules. Their diameter was 1.5-2.0 times smaller (hypoplasia) than normal.

In the second series of studies, when analysing of biopsies of 23 patients with hypogonadotropic hypogonadism (increased FSH and LH, group 1) it was found that in three (13.0 %) man with a history of viral orchitis in the histological report all tubules thickened and sclerosed, their lumen is narrowed, spermatogenesis cells and Sertoli cells are absent, in the interstitium severe fibrosis is observed.

Histological analysis of 20 patients (87.0 %) revealed that in almost all tubules there is only one cell row, constructed from Sertoli cells extended perpendicular to the basement membrane, which are located in parallel to each other. The lumen of the tubules is empty. Only in single tubules there is a small number of germinogenic cells, represented mainly by spermatogonia.

The histological picture was similar in men after orchopexy, transferred viral orchitis, chlamydial and bacterial orchoepididymitis and in men without a burdened andrological history.

In group 2 a histological analysis showed a reduced number of germinogenic cells represented mainly by spermatogonia and spermatocytes in the tubules of four (21.0 %) patients. Mature cells of the final stages of spermatogenesis were not detected. The histological picture of other 15 (79.0 %) patients is almost similar. In almost all tubules there is only one cell row, constructed from elongated perpendicular to the basement membrane of Sertoli cells. The lumen of the tubules is empty and only in single tubules there is a small number of germinogenic cells, represented mainly by spermatogonia. Nine (60.0 %) of these 15 patients have been observed with swelling of small groups of Leydig cells in the interstitium and six

patients (40.0 %) with thickened and sclerosed walls of some tubules, focal fibrosis in the stroma.

Two patients of group 3 with an unencumbered anamnesis and palpation of normal external genitalia have been observed with aplasia of germinogenic cells. In most tubules there is only one cell row constructed from elongated Sertoli cells perpendicular to the basement membrane, located in parallel to each other. In a part of tubules 1-2 rows of cells in which Sertoli cells prevail are defined and insignificant number of spermatogonia is found. The lumen of the tubules is mostly empty. Cells of late stages of spermatogenesis and mature spermatozoa in the lumen of the tubules have not been detected.

Among 23 patients (group 4) with normogonadotropic hypogonadism, two (8.7 %) till 3 years of age were operated on for bilateral cryptorchidism, two (8.7 %) underwent Bergman's operation on one side, one (4.3 %) had Ivanisevich's operation, one (4.3 %) received high doses of corticosteroids in the neonatal period due to respiratory problems, one (4.3 %) for 2 years before examination and testicular biopsy had worked in hazardous industries, the other 16 (69.7 %) patients deny andrological history. Eight (34.8 %) patients were diagnosed with testicular hypoplasia (including those who underwent orchopexy, orchitis, two with an unencumbered anamnesis). The pathology of the external genitalia was not detected by palpation in 15 (65.2 %) patients.

50 patients with preserved spermatogenesis all were diagnosed with posttesticular (excretory-obstructive infertility, obstructive azoospermia). Among the examined 26 (52.0 %) during the collection of anamnesis it was possible to detect a history of orchoepididymitis, one (2.0 %) patient underwent bilateral orchopexy at the age of 5 due to cryptorchidism, three (6,0 %) recalled an injury wickets in the anamnesis, the remaining 20 (40.0 %) any, affecting fertility factors in the anamnesis were denied.

Moderate testicular hypoplasia (less than 4 cm in the largest size) was observed in six (12.0 %) patients. Only six patients (12.0 %) had palpable areas of compaction at the level of the distal parts of the vas deferens and the excretory duct of the epididymis. Two (4.0 %) patient at ultrasound have been visualized with highly

calcined vas deferens (a patient with suspected extrapulmonary tuberculosis). In five (10.0 %) patients the distal parts of the vas deferens were not palpated, in the other 31 (62.0 %) patients with palpation of the scrotum were not detected pathology, even that 16 of them were after orchochepididymitis.

Testicular biopsy is a traumatic method and obtaining testicular tissue samples is much more difficult than taking blood samples for research. Therefore, there is a need to look for other biomarkers of spermatogenesis in particular in venous blood.

It is important to establish the hormonal status of the patient. The level of follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), testosterone (T) in the venous blood are determined for that. Thus, hypogonadotropic hypogonadism at NOA is promising for the therapy condition. This is an endocrine disease characterized by insufficient spermatogenesis due to lack of gonadotropin stimulation.

Our data indicate that in 23 patients (group 1) with primary hypergonadotropic hypogonadism, the level of FSH in the blood is 28.1±3.75 IU/L.

In group 2 (n=19) with testicular infertility (hypergonadotropic hypogonadism, isolated increase in FSH) the level of FSH is 2 times lower compared to group 1 and is 13.85±0.62 IU/L. In group 3 (n=4) in patients with testicular infertility (hypergonadotropic hypogonadism, isolated increase in LH), the level of FSH is still normal and is 8.75±0.75 IU/ml. In secretory infertility with normogonadotropic hypogonadism (group 4, n=23), the level of FSH is 6.2±0.5 IU/ml.

The level of LH in group 1 with testicular infertility (hypergonadotropic hypogonadism, elevated FSH and LH) is 12.52±1.63 IU/L. In group 2 with secretory-endocrine infertility (hypergonadotropic hypogonadism, isolated increase in FSH), this figure is 5.3±0.64 IU/L. In group 3 with testicular infertility (hypergonadotropic hypogonadism, isolated increase in LH) the level of LH is equal to 8.65±0.15 IU/L. In group 4, in patients with secretory infertility with normogonadotropic hypogonadism, the LH level was 4.8±0.5 IU/ml.

Regarding testosterone, in group 1 its level was 16.13±3.51, in group 2 it was 14.63±4.95, in group 3 it was 11.6±0.4 and in group 4 it was 30.7±7.5 nmol/L. Only

three (16.7%) patients in group 1 had reduced testosterone levels. Decreased testosterone levels were also observed in five (33.3%) patients of group 2.

In group 1, the concentration of estradiol was 23.74±6.89, in group 2 it was 40.1±12.7, in group 3 it was 34.0±1.1, and in group 4 it was 36.8±8.1 pg/ml. The concentration of prolactin in the blood of patients in group 1 was 12.42±2.24, in group 2 it was 8.6±0.4, in group 3 it was 3.1±1.3 and in group 4 it was 8.3±1.2 ng/ml. One (5.6%) of 18 patients with moderate hyperprolactinemia has been revealed. The tendency to increase the level of prolactin in this group was important.

In group 1, there was a strong correlation between FSH and LH (r=0.46), between LH and total testosterone (r=0.57) and between LH and estradiol (r=0.64) (thus, with increasing value of one indicator another one was growing).

A strong inverse correlation was found between estradiol and prolactin (r=-0.98), estradiol and FSH (r=-0.87), LH and prolactin (r=-0.53) (thus, with increasing value of one indicator another one was growing).

In group 2, a direct correlation was observed between FSH and total testosterone (r=0.6). Strong inverse relationship between total testosterone and estradiol (r=-0.77), FSH and LH (r=-0.51), which cannot be unambiguously interpreted, testosterone and prolactin (r=-0.59).

Moderately elevated LH and normal levels of FSH, testosterone, and estradiol with slightly reduced prolactin were observed in two patients in group 3.

In group 4, no relationship was found between the presence of azoospermia and history or objective examination. Only one (4.3 %) patient had a low testosterone concentration of 6.5 nmol/L, and another (4.3 %) patient had a high estradiol concentration of 91.12 pg/ml. In this group, a correlation was observed between LH and prolactin (r=0.74). Hyperprolactinemia was not observed in any case.

Thus, judging by our data, we can conclude that in general the concentration of FSH in the serum is inversely correlated with the severity of spermatogenesis.

At posttesticular (excretory-obstructive) infertility (obstructive form of azoospermia) the level of FSH in the blood of patients (n=50) was 5.72±1.34 IU/L, the level of LH was 5.29±0.53 IU/L, the level of total testosterone was 17.25±2.46 nmol/L, estradiol was 42.42±7.76 pg/ml, and prolactin was 6.0±0.8 ng/ml.

The obtained own and literature data show that in addition to histological analysis of testicular biopsies, inhibin B is the most important biochemical marker for the assessment of spermatogenesis at non-obstructive azoospermia.

We found that the level of this hormone at NOA decreased by 2.7 times, compared with normozoospermia. FSH levels have a significant prognostic value, mostly at hypergonadotropic hypogonadism while assessment of inhibin B levels is in many cases an alternative to biopsy for the differential diagnosis of male infertility.

According to modern ideas, the development of pathological processes in the body is accompanied by a violation of the mechanisms of antioxidant protection of cells. An important place among the antioxidant system (AOS) of the cell is occupied by the glutathione system, which components are involved in both enzymatic (glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione transferase) and non-enzymatic (glutathione) reactions of AOS.

We conducted a comparative study of the processes of LP and glutathione system in seminal plasma and serum of men diagnosed with azoospermia.

It is known that in addition to the enzymatic components of the antioxidant system, an important role belongs to non-enzymatic antioxidants such as reduced glutathione. It is a central component of the glutathione antioxidant system.

The state of the non-enzymatic component of the antioxidant system in seminal plasma was evaluated by the content of reduced, total and oxidized glutathione, and the redox index of glutathione calculated by the ratio of the difference between total and oxidized glutathione to total glutathione.

According to the results of the study of lipid peroxidation and individual components of the glutathione antioxidant system, it was found that the concentration of malonic dialdehyde (MDA) as a biomarker of lipid peroxidation in seminal plasma of control was 2.3±0.3 μM and at non-obstructive azoospermia was 3.5±0.3 μM, ie increased by 1.5 times. Total antioxidant activity at NOA decreased by 1.5 times. The concentration of reduced glutathione decreased by 1.8 times and the concentration of total glutathione decreased by 1.5 times. No significant changes in the concentration of oxidized glutathione were detected.

It can be considered that an important diagnostic test (marker) for NOA is the ratio of reduced glutathione to oxidized one. In sperm plasma at normozoospermia it is 1.5 and at NOA it is 0.9.

When study of certain non-enzymatic components of the glutathione antioxidant system in the blood serum, it was found that the total antioxidant activity at NOA decreased by 1.2 times. The concentration of reduced glutathione decreased by 1.8 times, and the concentration of total glutathione decreased by 1.2 times. However, as in the case of seminal plasma, no significant changes in the concentration of oxidized glutathione were detected.

Calculation of the redox index (RI GSH) showed a decrease in the total capacity of this system in the seminal plasma of men with non-obstructive azoospermia. No such decrease is observed in the serum. However, a sharp decrease in the concentration of reduced glutathione and its ratio to oxidized glutathione in the serum indicates its increased use in both seminal plasma and blood.

Simultaneously with the activation of lipid peroxidation, a significant decrease in glutathione peroxidase activity relative to control values in patients with NOA, from 35.3±3.3 nmol GSH/min·mg protein (normozoospermia) to 27.4±3.4 nmol GSH/min·mg protein (NOA) ($p<0,05$), ie 1.3 times. Regarding to the activity of glutathione reductase, no significant differences between the experimental and control groups were found ($p>0.05$).

When study of glutathione transferase activity, it was found that normally it is 7.38±0.82 nmol GSH/min·mg protein. At non-obstructive form of azoospermia, the activity of glutathione transferase is significantly reduced by 1.2 times ($p<0,05$).

The arginase-NO synthase system is involved in the regulation of virtually all intracellular processes, including cell proliferation and differentiation. Nitric oxide (NO), produced in the NO-synthase reaction, regulates the process of spermatogenesis, affects the viability and motility of spermatozoa. As a result of our experiments, it was found that at NOA in seminal plasma arginase activity is 7.6±0.8 nmol urea/min per 1 mg of protein, while at normozoospermia this activity was much higher and was equal to 11, 5±1.8 nmol of urea/min per 1 mg of protein ($p<0.05$).

It was found that the activity of cNOS in the seminal plasma of almost healthy men (normozoospermia) is (21.4±2.9) nmol NADPH (H^+)/min per 1 mg of protein. At NOA, the activity of cNOS does not changes significantly relative to control and is 18.2±2.3 nmol NADPH(H^+)/min per 1 mg of protein ($p>0.05$). The activity of iNOS in the seminal plasma of almost healthy men is identified to a small extent, almost on the verge of error and is 1.12±0.02 nmol NADPH(H^+)/min per 1 mg of protein. At NOA, the activity of iNOS, which is Ca^{2+}-independent, increases relative to control by 17.7 times and is 19.8±2.2 nmol NADPH(H^+)/min per 1 mg of protein.

We studied the ratio of arginase activity to iNOS. For normozoospermia it is 11.9 and for NOA it is 0.5. Thus, the seminal plasma arginase/iNOS ratio may be an important indicator of the development of nonobstructive azoospermia. It also follows that inhibition of iNOS may be a potential therapeutic target in the treatment of azoospermia.

In patients with azoospermia, there was a significant decrease of NO_2 concentration in seminal plasma up to 1.43±0.24 μmol/L, ie 1.6 times ($p<0.01$). As for NO_3-, its concentration significantly increased, from 4.11±0.56 (control) to 6.97±0.83 μmol/L, ie 1.5 times ($p<0.01$). It is important to note that the azoospermia significantly increases the NO_3-/NO_2- ratio by 4.9 times. While at norm, this ratio is equal to 2.0 times. It is known that not only nitric oxide itself but also its derivatives perform important physiological functions, participate in the regulation of apoptosis, angiogenesis and free radical processes.

In general, the results obtained by us indicate a violation of the arginase-NO-synthase system of blood lymphocytes, which leads to an imbalance of the regulatory systems of lymphocytes, in particular the regulatory function of NO. It is assumed that NO, which is formed in excessive amounts at pathological conditions of the body, has a pronounced cytotoxic effect due to the formation of peroxynitrite.

In addition to nitric oxide, ionized Ca^{2+} also plays a key role in the regulation of almost all intracellular processes, including cell proliferation and differentiation, apoptosis, etc. An important role in maintaining intracellular Ca^{2+} homeostasis is played by Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase of the plasma membrane and endoplasmic reticulum which function is to reduce the concentration of this ion in the cytosol.

We studied the activities of Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase of the plasma membrane of lymphocytes of practically healthy men, as well as patients with azoospermia. It was found that Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPhase activity of the plasma membrane of blood lymphocytes of almost healthy men with normozoospermia was 2.79±0.2 μmol Pi/min per 1 mg of protein. In patients with OA the activity of Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase of the plasma membrane of blood lymphocytes did not differ significantly from the physiological norm and was 2.73±0.31 μmol P_i/min per 1 mg of protein ($p>0.05$). At NOA, the activity of this enzyme decreased to 1.25±0.24 μmol P_i/min per 1 mg of protein ($p<0.05$), ie decreased by 1.5 times. Decreased Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase activity of the plasma membrane of lymphocytes in the blood of patients with NOA indicates an increase in [Ca^{2+}] in the cytosol of lymphocytes.

When study of Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase activity of the ER membranes of blood lymphocytes of persons with OA and NOA, it was found that it is 1.91±0.27 and 1.76±0.22 μmol P_i/min per 1 mg of protein, respectively. At normozoospermia, this activity is 2.31±0.28 μmol P_i min per 1 mg of protein. Significant decrease in Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase activity is observed only at NOA ($p<0.05$). Decreased Ca^{2+},Mg^{2+}-ATPase activity of the plasma membrane and ER membranes of blood lymphocytes of patients with NOA indicates an increase in [Ca^{2+}] i in the cytosol of lymphocytes, ie their overload with ionized Ca^{2+}. The increase in the concentration of Ca^{2+} in the cytosol indicates a violation of the regulatory systems of the cell and this is characteristic of many pathologies.

Regarding cytogenetic changes, in the first three groups of patients no genetic changes were detected at karyotyping. In group 4 with testicular infertility (normogonadotropic hypogonadism) only one (4.3 %) patient with karyotype 46 XY, 9ph was revealed.

Among 50 patients of group with preserved spermatogenesis (posttesticular excretory-obstructive infertility), only one had karyotype 46 XY (4) (p152q12). Another four (8.0 %) patients were found to be heterozygous for the F508del mutation of the TRBM gene, which probably caused agenesis of the ductus deferens. In 45 (90.0 %) patients with karyotype 46 XY in the studied parts of the Y

chromosome microdeletions were not detected and the analyzed mutations in the TRPM gene were not detected.

Thus, studies have shown that at the non-obstructive form of azoospermia not only morphofunctional changes occur in the testes or in hormone metabolism but also biochemical changes in seminal plasma, serum and blood lymphocytes. These changes are especially manifested in the violation of the regulatory systems of the cell such as pro- and antioxidant, arginase-NO-synthase and Ca^{2+}-ATP-dependent. Important additional indicators of azoospermia may be an increase in seminal plasma activity of the inducible isoform of NO synthase, the ratio of reduced glutathione to oxidized, the ratio of arginase activity to the inducible isoform of NO synthase, and the ratio of metabolites of nitric oxide NO_3^-/NO_2^-.

Key words: infertility, azoospermia, testicular infertility, posttesticular infertility, testicular elastography, oxidative stress, arginase-NO-synthase system, Ca^{2+}-dependent ATP-hydrolase system, prognostic markers of azoospermia.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

– **в наукових періодичних фахових виданнях України, в т.ч., що входять до міжнародних наукометричних баз**:

1. Воробець ДЗ, Поспішіль ЮО, Марухняк РВ, **Воробець МЗ.** Екскреторно-обтураційна неплідність: аналіз клінічних та гістологічних параметрів. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2012;60(4):88-92. *(Здобувачем особисто проведено аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві*).
2. Воробець ДЗ, Поспішіль ЮО, Марухняк РВ, **Воробець МЗ.** Аналіз даних гістологічних заключень біоптатів яєчок і гормональних показників у

хворих з аспермією/азооспермією при первинній тестикулярній патології. Практична медицина. 2012;18(3):77-86. *(Здобувачу належить ідея проведення досліджень та узагальнення результатів; аналіз літературних джерел, виконання лабораторних дослідження, аналіз отриманих даних, написання та оформлення публікації виконано у співавторстві).*

3. Воробець ДЗ, Поспішіль ЮО, Марухняк РВ, **Воробець МЗ.** Гістологічна картина біоптату яєчок і рівень статевих гормонів у хворих з аспермією/азооспермією. Здоровье мужчины. 2012;3:177-181. *(Здобувачу належить ідея проведення досліджень та узагальнення результатів; аналіз літературних джерел, виконання лабораторних дослідження, аналіз отриманих даних, написання та оформлення публікації виконано у співавторстві).*
4. Vorobets D, Pospishil Yu, **Vorobets M.** Testicle biopsy results of patients with the non-obstructive azoospermia. Здоровье мужчины. 2012;4/2:71-73. *(Здобувачу належить ідея проведення досліджень та узагальнення результатів; аналіз літературних джерел, виконання лабораторних дослідження, аналіз отриманих даних, написання та оформлення публікації виконано у співавторстві).*
5. **Vorobets MZ,** Fafula RV**,** Besedina AS, Onufrovych OK, Vorobets DZ. Glutathione S-transferase as a marker of oxidative stress in human ejaculated spermatozoa from patients with pathospermia. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2018;9(2):287-292. *(Здобувачу належить ідея проведення досліджень та узагальнення результатів; аналіз літературних джерел, виконання лабораторних дослідження, аналіз отриманих даних, написання та оформлення публікації виконано у співавторстві).*
6. Fafula RV, Onufrovych OK, Iefremova UP, **Vorobets MZ,** Nakonechnyi IA, Melnyk OV, Fedorovych ZYa, Vorobets ZD. Prooxidant/antioxidant balance in sperm cells of infertile men. World of Medicine and Biology. 2018;4(66):120-124. *(Здобувачем особисто проведено аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз та узагальнення*

отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).

7. Воробец ЗД, Фафула РВ, **Воробец МЗ,** Мельник ОВ. Аргиназный и NO-синтазный пути метаболизма L-аргинина в сперматозоидах мужчин при различных формах патоспермии. Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии: Сб. научных статей II Белорусского биохим. конгресса. 2018:61-67. *(Здобувачем особисто проведено аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві*).
8. Борис ЮБ, **Воробець МЗ**, Луцик ММ, Онуфрович ОК, Воробець ДЗ. Характеристика гістологічних і біохімічних показників хворих із різними формами азооспермії. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2019;86(1/1):108-114. *(Здобувачем особисто проведено аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві*).
9. **Воробець МЗ,** Фафула РВ, Воробець ДЗ. Сучасні погляди на патогенез і маркери азооспермії у чоловіків. Вісник проблем біології і медицини. 2020;1(155):26-33. *(Здобувачу належить ідея проведення досліджень та узагальнення результатів; аналіз літературних джерел, виконання лабораторних дослідження, аналіз отриманих даних, написання та оформлення публікації виконано у співавторстві).*

- **в наукових періодичних виданнях інших держав, в т.ч., що входять до міжнародних наукометричних баз:**
-

10. **Vorobets M,** Onufrovych O**,** Fafula R, Borzhievsky A, Vorobets Z. Pro-/antioxidant system in the development of non-obstructeve form of azoospermia. Polish Journal of Science. 2020;30(1):15-18. *(Здобувачу належить ідея проведення досліджень та узагальнення результатів;*

аналіз літературних джерел, виконання лабораторних дослідження, аналіз отриманих даних, написання та оформлення публікації виконано у співавторстві).

11. Kozopas NM, Chornenka OI, **Vorobets MZ**, Lapovets LYe, Maksymyuk HV. Body mass index and sperm quality: is there a relationship ? Journal of Human Reproductive Sciences. 2020;13(2):109-113. *(Здобувачу належить ідея проведення досліджень та узагальнення результатів; аналіз літературних джерел, виконання лабораторних дослідження, аналіз отриманих даних, написання та оформлення публікації виконано у співавторстві).*

– **які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

12. **Воробець МЗ,** Воробець ДЗ. Рівень статевих гормонів у пацієнтів із необструктивною формою азооспермії. Збірник праць XIII Міжнародної міждисциплінарної науково-практичної конференції «Сучасні аспекти збереження здоров'я людини» (3-4.04.2020, Ужгород). 2020:255-260. *(Здобувачем особисто проведено аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві*).
13. **Воробець МЗ,** Фафула РВ**,** Онуфрович ОК**,** Єфремова УП. Взаємозв'язок гормонального профілю крові та активності аргінази лімфоцитів при неплідності чоловіків. Матер. X Науково-практ. конф. з міжнародною участю «Актуальні проблеми патології за умов дії надзвичайних факторів на організм (Тернопіль, 5-6.10.2017). Тернопіль. 2017:9-10. *(Здобувачем особисто проведено аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві*).
14. **Воробець МЗ,** Онуфрович ОК**,** Фафула РВ. Патоспермія чоловіків та аргіназна/NO-синтазна система сперматозоїдів. Актуальні проблеми

довкілля та здоров’я людини в умовах екологічних і соціальних змін у Європі та в Україні. Матер. наук.-практ. конф. з міжнародною участю (Тернопіль, 24-26.05.2018). Тернопіль. 2018:21-23. *(Здобувачу належить ідея проведення досліджень та узагальнення результатів; аналіз літературних джерел, виконання лабораторних дослідження, аналіз отриманих даних, написання та оформлення публікації виконано у співавторстві).*

15. Iefremova UP, **Vorobets MZ**, Nakonechnyi IA, Fafula RV, Onufrovych OK, Melnyk OV. Pro-oxidant/antioxidant system in spermatozoa of infertile men. XVII International congress of medical sciences. Abstract book (Sofia, 10-13.05.2018). Sofia. 2018:78. *(Здобувачу належить ідея проведення досліджень та узагальнення результатів; аналіз літературних джерел, виконання лабораторних дослідження, аналіз отриманих даних, написання та оформлення публікації виконано у співавторстві).*
16. **Воробець МЗ,** Онуфрович ОК**,** Фафула РВ. Характеристика NO-синтазної системи сперматозоїдів чоловіків при різних формах патоспермії. Здобутки клінічної та експериментальної медицини. Матер. LXI наук.-практ. конф. (Тернопіль, 07.06.2018). Тернопіль. 2018:20-21. *(Здобувачу належить ідея проведення досліджень та узагальнення результатів; аналіз літературних джерел, виконання лабораторних дослідження, аналіз отриманих даних, написання та оформлення публікації виконано у співавторстві).*
17. **Воробець МЗ,** Онуфрович ОК. Аналіз гістологічних параметрів біоптатів яєчок і рівня статевих гормонів у чоловіків з азооспермією. Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм. Мат. XI наук.-практ. конф. (з міжнарод. участю). (Тернопіль, 04-05.10.2018). Тернопіль. 2018:7. *(Здобувачем особисто проведено аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві*).

18. Борис ЮБ, **Воробець МЗ**, Луцик ММ, Онуфрович ОК, Воробець ДЗ. Характеристика гістологічних і біохімічних показників хворих із різними формами азооспермії. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2019;86(1/1):108-114. *(Здобувачем особисто проведено аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві*).
19. **Воробець МЗ**, Борис ЮБ, Воробець ЗД. Функціонування ензимів аргіназа/NO-синтазної системи лімфоцитів крові чоловіків за азооспермії. Фізіологічний журнал. Матер. XX-го зїзду Укр. фізіол. товариства ім. П.Г. Костюка з міжнар. участю (27-30.05.2019, Київ). 2019;65(3):13. *(Здобувачем особисто проведено аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві*).
20. **Воробець МЗ,** Луцик ММ**,** Борис ЮБ. Функціонування системи оксиду азоту в лімфоцитах крові при азооспермії чоловіків. 6th Ukrainian congress for cell biology with international representation (Yaremche, 13-21.06.2019). Yaremche. 2019:55. *(Здобувачу належить ідея проведення досліджень та узагальнення результатів; аналіз літературних джерел, виконання лабораторних дослідження, аналіз отриманих даних, написання та оформлення публікації виконано у співавторстві).*
21. Kozopas N, Kost A, Maksymyuk H, **Vorobets M.** Effect of obesity and metabolic sindrome on semen quality. 14th Bialystok International Medical Congress for Young Scientist (May 2019). 2019:47. *(Здобувачу належить ідея проведення досліджень та узагальнення результатів; аналіз літературних джерел, виконання лабораторних дослідження, аналіз отриманих даних, написання та оформлення публікації виконано у співавторстві).*
22. **Воробець МЗ,** Онуфрович ОК**,** Борис ЮБ**,** Воробець ДЗ. Функціонування NO-синтазної та глутатіонової антиоксидантної систем у лімфоцитах

крові чоловіків з азооспермією. Медична та клінічна хімія. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу (30.09-04.10.2019, Тернопіль). 2019;3(80):71. *(Здобувачем особисто проведено аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві*).

23. **Воробець МЗ,** Боржієвський АЦ, Фафула РВ, Воробець ЗД. Показники оксидативного стресу при азооспермії у чоловіків. Матеріали XVIII Когресу СФУЛТ (1-3.10.2020, Львів). Львів. 2020:72. *(Здобувачем особисто проведено аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві*).