

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**ВОРОБЕЦЬ МИКОЛА ЗІНОВІЙОВИЧ**

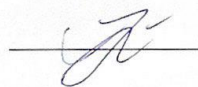
УДК 616.69-008.811.4-02:616.669]-036-07

ДИСЕРТАЦІЯ  
**КЛІНІКО-ПАТОГЕНЕТИЧНІ МАРКЕРИ РОЗВИТКУ НЕПЛІДНОСТІ  
ЧОЛОВІКІВ З АЗОСПЕРМІЄЮ**

222 – Медицина

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають постилання на відповідне джерело

 М.З. Воробець

Науковий керівник – Борис Юрій Богданович,  
доктор медичних наук, професор;  
– Боржієвський Андрій Цезарович,  
доктор медичних наук, професор

ЛЬВІВ – 2021

## АНОТАЦІЯ

*Воробець М.З.* «Клініко-патогенетичні маркери розвитку неплідності чоловіків з азооспермією» - 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 спектру 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 непліддя, 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 індукцибельної ізоформ NO-синтази), Ca<sup>2+</sup>-залежних АТФ-гідролазних систем плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму.

Оскільки непліддя 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 гіпогонадізму 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 ячок у контрольній групі в середньому складав  $22,3 \pm 2,1$  см<sup>3</sup>, при діапазоні від 18,3 до 25,1 см<sup>3</sup>. У групі з необструктивною азооспермією об'єм ячок в середньому складав  $16,7 \pm 1,7$  см<sup>3</sup>, в діапазоні від 12 до 21,1 см<sup>3</sup>. У чотирьох чоловіків з нормозооспермією об'єм ячок був менше 18 см<sup>3</sup>.

Аналіз різних груп пацієнтів із необструктивною формою азооспермії показав, що серед 23 чоловіків (група 1) із первинним гіпергонадотропним гіпогонадізмом – 4 (17,5 %) в анамнезі перенесли вірусний орхіт в дитинстві, в одного (4,3 %) відзначений зменшений розмір ячок в калитці з дитинства після перенесеної операції з приводу флегмони калитки, в одного (4,3 %) відмічена відсутність правого ячка 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 ячка пальпаторно були гіпоплазовані.

Важливе діагностичне значення мають гемодинамічні показники паренхіматозного кровотоку яєчок в інфертильних чоловіків, що отримані за допомогою ультразвукової доплерографії. Середнє значення лінійної швидкості кровотоку (ЛШК) в артеріях паренхіми у чоловіків із нормозооспермією справа складало  $0,107 \pm 0,015$  м/с, а зліва —  $0,103 \pm 0,012$  м/с. При азооспермії середнє значення ЛШК справа складало  $0,086 \pm 0,012$  м/с, а зліва —  $0,084 \pm 0,008$  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 каналцях. 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 каналців 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 каналцях наявний лише один клітинний ряд, побудований із витягнутих перпендикулярно до базальної мембрани клітин Сертолі, які розташовані паралельно одна до одної. Просвіт каналців порожній. Лише в поодиноких каналцях 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 каналцях наявна зменшена рядність герміногенних клітин, представлених здебільшого сперматогоніями і сперматоцитами. Зрілих клітин кінцевих стадій сперматогенезу не виявлено. У інших 15 (79,0 %) пацієнтів гістологічна картина практично аналогічна. Майже в усіх каналцях наявний лише один клітинний ряд, побудований із витягнутах перпендикулярно до базальної мембрани клітин Сертолі. Просвіт каналців порожній і лише в поодиноких каналцях 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 каналців 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 каналців наявний тільки один клітинний ряд, побудований із витягнутих перпендикулярно до базальної мембрани клітин Сертолі, що розташовані паралельно одна до одної. У частині каналців визначаються 1-2 клітинні ряди, в яких переважають клітини Сертолі і виявляється незначна кількість сперматогоній. Просвіт каналців здебільшого порожній. Клітин пізніх стадій сперматогенезу та зрілих сперматозоїдів у просвіті каналців не виявлено.

Серед 23 пацієнтів (група 4) з нормогонадотропним гіпогонадізмом, 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 Іванісеви́ча, один (4,3 %) – в неонатальний період отримувач високі дози кортикостероїдів із приводу проблем із диханням, один (4,3 %) – працював 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 позалегеновий 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, ніж отримання сім'яної плазми чи зразків крові для досліджень. Тому, існує потреба в пошуках інших прогностичних показників сперматогенезу.

Оскільки порушення сперматогенезу часто є наслідком відсутності 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  $28,1 \pm 3,75$  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  $13,85 \pm 0,62$  МО/л. У групі 3 ( $n = 4$ ) у пацієнтів із секреторно-ендокринною неплідністю (гіпергонадотропний гіпогонадізм, ізольоване підвищення ЛГ) рівень ФСГ нормальний і становить  $8,75 \pm 0,75$  МО/мл. При секреторній неплідності з нормогонадотропним гіпогонадізмом (група 4,  $n=23$ ) рівень ФСГ становить  $6,2 \pm 0,5$  МО/мл.

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

Щодо тестостерону, то в групі 1 його рівень складає  $16,13 \pm 3,51$ , в групі 2 –  $14,63 \pm 4,95$ , в групі 3 –  $11,6 \pm 0,4$  і в групі 4 –  $30,7 \pm 7,5$  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  $23,74 \pm 6,89$ , в групі 2 –  $40,1 \pm 12,7$ , в групі 3 –  $34,0 \pm 1,1$ , і в групі 4 –  $36,8 \pm 8,1$  пг/мл. Концентрація пролактину в крові пацієнтів групи 1 складала  $12,42 \pm 2,24$ , групи 2 –  $8,6 \pm 0,4$ , групи 3 –  $3,1 \pm 1,3$ , а групи 4 –  $8,3 \pm 1,2$  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 - зростає 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 – зростає 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 зворотно пропорційно корелює з вираженістю порушення сперматогенезу.

При екскреторно-обтураційній неплідності (обструктивна форма азооспермії) рівень ФСГ у крові пацієнтів ( $n = 50$ ) складав  $5,72 \pm 1,34$  МО/л, рівень ЛГ –  $5,29 \pm 0,53$  МО/л, рівень загального тестостерону –  $17,25 \pm 2,46$  нмоль/л, естрадіолу –  $42,42 \pm 7,76$  пг/мл, а пролактину –  $6,0 \pm 0,8$  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 непліддя 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 знижувалась 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 окисненого в спермальній плазмі: при нормозооспермії – 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 рази ( $p < 0,05$ ).

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 рази 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 рази ( $p < 0,001$ ).

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 концентрації  $NO_2^-$ , у 1,6 рази ( $p < 0,001$ ). Щодо  $NO_3^-$ , то його концентрація достовірно зростала в 1,5 рази ( $p < 0,001$ ). Важливо відмітити, що при азооспермії суттєво зростає співвідношення  $NO_3^-/NO_2^-$ , у 4,9 рази. В той час як у нормі це співвідношення дорівнює 2,0 рази. 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, ангиогенезу, 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  $\text{Ca}^{2+}$  також відіграє ключову роль в регуляції практично всіх внутрішньоклітинних процесів, включаючи проліферацію та диференціацію клітин, апоптоз тощо [72, 78, 100, 108]. Важлива роль у підтриманні внутрішньоклітинного гомеостазу  $\text{Ca}^{2+}$  відводиться  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазі плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму, функція яких полягає у зниженні концентрації даного іону в цитозолі.

Встановлено, що  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності мембран ЕПР лімфоцитів крові осіб із ОА та НОА виявлено, що достовірне зниження її спостерігається тільки при НОА ( $p < 0,05$ ).

Зниження  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності плазматичної мембрани і мембран ЕПР лімфоцитів крові пацієнтів з НОА свідчить про зростання  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  у цитозолі лімфоцитів, тобто перевантаження їх іонізованим  $\text{Ca}^{2+}$ . Зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  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 гіпогонадізм) 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 мікрodelецій 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  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-залежної. Важливими додатковими прогностичними показниками азооспермії можуть бути зростання в сім'яній плазмі активності індукцибельної ізоформи NO-синтази, співвідношення відновленого глутатіону до окисненого, редокс-індекс відновленого глутатіону, співвідношення активності аргінази до індукцибельної ізоформи NO-синтази, а також співвідношення метаболітів оксиду азоту –  $\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$ , бальна оцінка гістологічних показників біоптатів яєчок.

**Ключові слова:** непліддя, азооспермія, секреторно-ендокринна неплідність, екскреторно-обтураційна неплідність, еластографія яєчок, оксидативний стрес, аргіназо-NO-синтазна система,  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $22.3 \pm 2.1 \text{ cm}^3$  in the range from 18.3 to 25.1  $\text{cm}^3$ . In the azoospermia group, the average testicular volume was  $16.7 \pm 1.7 \text{ cm}^3$ , ranging from 12 to 21.1  $\text{cm}^3$ . In four men with normozoospermia testicular volume was less than 18  $\text{cm}^3$ .

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 orchepididymitis.

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  $0.107\pm 0.015$  m/s and from the left side  $0.103\pm 0.012$  m/s. At azoospermia, the average value of LVF of the right side was  $0.086\pm 0.012$  m/s and of the left side  $0.084\pm 0.008$  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 orchoepididymitis.

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  $28.1 \pm 3.75$  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  $13.85 \pm 0.62$  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  $8.75 \pm 0.75$  IU/ml. In secretory infertility with normogonadotropic hypogonadism (group 4, n=23), the level of FSH is  $6.2 \pm 0.5$  IU/ml.

The level of LH in group 1 with testicular infertility (hypergonadotropic hypogonadism, elevated FSH and LH) is  $12.52 \pm 1.63$  IU/L. In group 2 with secretory-endocrine infertility (hypergonadotropic hypogonadism, isolated increase in FSH), this figure is  $5.3 \pm 0.64$  IU/L. In group 3 with testicular infertility (hypergonadotropic

hypogonadism, isolated increase in LH) the level of LH is equal to  $8.65 \pm 0.15$  IU/L. In group 4, in patients with secretory infertility with normogonadotropic hypogonadism, the LH level was  $4.8 \pm 0.5$  IU/ml.

Regarding testosterone, in group 1 its level was  $16.13 \pm 3.51$ , in group 2 it was  $14.63 \pm 4.95$ , in group 3 it was  $11.6 \pm 0.4$  and in group 4 it was  $30.7 \pm 7.5$  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  $23.74 \pm 6.89$ , in group 2 it was  $40.1 \pm 12.7$ , in group 3 it was  $34.0 \pm 1.1$ , and in group 4 it was  $36.8 \pm 8.1$  pg/ml. The concentration of prolactin in the blood of patients in group 1 was  $12.42 \pm 2.24$ , in group 2 it was  $8.6 \pm 0.4$ , in group 3 it was  $3.1 \pm 1.3$  and in group 4 it was  $8.3 \pm 1.2$  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  $5.72 \pm 1.34$  IU/L, the level of LH was  $5.29 \pm 0.53$  IU/L, the level of total testosterone was  $17.25 \pm 2.46$  nmol/L, estradiol was  $42.42 \pm 7.76$  pg/ml, and prolactin was  $6.0 \pm 0.8$  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  $2.3 \pm 0.3 \mu\text{M}$  and at non-obstructive azoospermia was  $3.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$ , 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  $35.3 \pm 3.3 \text{ nmol GSH/min}\cdot\text{mg protein}$  (normozoospermia) to  $27.4 \pm 3.4 \text{ nmol GSH/min}\cdot\text{mg protein}$  (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  $7.38 \pm 0.82 \text{ nmol GSH/min}\cdot\text{mg protein}$ . 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  $7.6 \pm 0.8$  nmol urea/min per 1 mg of protein, while at normozoospermia this activity was much higher and was equal to  $11, 5 \pm 1.8$  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  $(21.4 \pm 2.9)$  nmol NADPH ( $H^+$ )/min per 1 mg of protein. At NOA, the activity of cNOS does not change significantly relative to control and is  $18.2 \pm 2.3$  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  $1.12 \pm 0.02$  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  $19.8 \pm 2.2$  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  $1.43 \pm 0.24$   $\mu$ mol/L, ie 1.6 times ( $p < 0.01$ ). As for  $NO_3^-$ , its concentration significantly increased, from  $4.11 \pm 0.56$  (control) to  $6.97 \pm 0.83$   $\mu$ mol/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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis is played by  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase of the plasma membrane of lymphocytes of practically healthy men, as well as patients with azoospermia. It was found that  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity of the plasma membrane of blood lymphocytes of almost healthy men with normozoospermia was  $2.79 \pm 0.2$   $\mu\text{mol Pi/min}$  per 1 mg of protein. In patients with OA the activity of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase of the plasma membrane of blood lymphocytes did not differ significantly from the physiological norm and was  $2.73 \pm 0.31$   $\mu\text{mol Pi/min}$  per 1 mg of protein ( $p > 0.05$ ). At NOA, the activity of this enzyme decreased to  $1.25 \pm 0.24$   $\mu\text{mol Pi/min}$  per 1 mg of protein ( $p < 0.05$ ), ie decreased by 1.5 times. Decreased  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity of the plasma membrane of lymphocytes in the blood of patients with NOA indicates an increase in  $[\text{Ca}^{2+}]$  in the cytosol of lymphocytes.

When study of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity of the ER membranes of blood lymphocytes of persons with OA and NOA, it was found that it is  $1.91 \pm 0.27$  and  $1.76 \pm 0.22$   $\mu\text{mol Pi/min}$  per 1 mg of protein, respectively. At normozoospermia, this activity is  $2.31 \pm 0.28$   $\mu\text{mol Pi/min}$  per 1 mg of protein. Significant decrease in  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity is observed only at NOA ( $p < 0.05$ ). Decreased  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity of the plasma membrane and ER membranes of blood lymphocytes of patients with NOA indicates an increase in  $[\text{Ca}^{2+}]$  i in the cytosol of lymphocytes, ie their overload with ionized  $\text{Ca}^{2+}$ . The increase in the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ .

**Key words:** infertility, azoospermia, testicular infertility, posttesticular infertility, testicular elastography, oxidative stress, arginase-NO-synthase system,  $\text{Ca}^{2+}$ -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. Здоров'є мужчини. 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. Здоров'є мужчини. 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. Воробець ЗД, Фафула РВ, **Воробець МЗ**, Мельник ОВ. Аргиназний и NO-синтазний 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-obstructive 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 з'їзду 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. 6<sup>th</sup> 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 syndrome on semen quality. 14<sup>th</sup> 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 Конгресу СФУЛТ (1-3.10.2020, Львів). Львів. 2020:187. *(Здобувачем особисто проведено аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*

## ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень .....	33
ВСТУП .....	35
<b>РОЗДІЛ 1. СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА ЕТІОЛОГІЮ, ПАТОГЕНЕЗ, ДІАГНОСТИКУ ТА ЛІКУВАННЯ ІНФЕРТИЛЬНИХ ЧОЛОВІКІВ З АЗООСПЕРМІЄЮ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ) .....</b>	<b>41</b>
1.1 Неплідність чоловіків – медико-соціальна проблема .....	41
1.2 Класифікація, етіопатогенетичні та клініко-діагностичні аспекти неплідності чоловіків при азооспермії .....	41
1.3 Діагностика типів азооспермії .....	43
1.4 Морфо-функціональна характеристика сім'яників при азооспермії .....	49
1.5 Гормональна регуляція сперматогенезу .....	52
1.6 Функціонування антиоксидантної та Ca <sup>2+</sup> - і NO-залежних регуляторних систем клітини при неплідності .....	55
1.7 Роль генетичних факторів у формуванні неплідності .....	59
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....</b>	<b>61</b>
2.1 Об'єкт досліджень. Загальна характеристика досліджуваних груп .....	61
2.2 Загальноклінічні дослідження .....	63
2.3 Спермограма та аналіз еякуляту .....	64
2.4 Ультразвукове дослідження з доплерографією та еластографією .....	64
2.5 Гістологічні дослідження біоптатів яєчок .....	65
2.6 Гормональні дослідження .....	66
2.7 Цитогенетичні дослідження .....	66
2.8 Біохімічні дослідження .....	67
2.9 Статистичний аналіз .....	74
<b>РОЗДІЛ 3. ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕНЬ ПАЦІЄНТІВ З АЗООСПЕРМІЄЮ .....</b>	<b>75</b>
3.1 Клінічна характеристика чоловіків із різними формами азооспермії .....	75
3.1.1 Результати інструментальних методів досліджень .....	79
3.1.2 Результати лабораторних методів досліджень .....	83

<b>РОЗДІЛ 4. МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА СІМ'ЯНИКІВ ПРИ АЗООСПЕРМІЇ</b> .....	86
4.1 Морфо-функціональна характеристика біоптатів яєчок при необструктивній формі азооспермії .....	86
4.2 Морфо-функціональна характеристика біоптатів яєчок при обструктивній формі азооспермії .....	92
<b>РОЗДІЛ 5. ГОРМОНАЛЬНА, БІОХІМІЧНА ТА ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СІМ'ЯНОЇ ПЛАЗМИ, СИРОВАТКИ КРОВІ ТА ЛІМФОЦИТІВ ПРИ АЗООСПЕРМІЇ</b> .....	99
5.1 Рівень статевих гормонів у пацієнтів із необструктивною формою азооспермії за різних видів секреторної неплідності .....	105
5.2 Рівень статевих гормонів у пацієнтів із обструктивною формою азооспермії .....	105
5.3 Концентрація інгібіну В в сироватці крові при необструктивній формі азооспермії .....	106
5.4 Про-/антиоксидантна система при азооспермії .....	108
5.5 Характеристика аргіназо-NO-синтазної системи при азооспермії .....	113
5.6 Характеристика $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаз при азооспермії .....	120
5.7 Цитогенетична характеристика лімфоцитів крові чоловіків з азооспермією .....	123
<b>РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ</b> .....	127
<b>ВИСНОВКИ</b> .....	142
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b> .....	145



## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- АОС – антиоксидантна система
- АТФ – аденозинтрифосфорна кислота
- АФК – активні форми кисню
- ЕПР – ендоплазматичний ретикулум
- ІКК – імунокомпетентні клітини
- ЛГ – лютеїнізуючий гормон
- ЛПК – лімфоцити периферичної крові
- ЛШК – лінгійна швидкість кровотоку
- МДА – малоновий діальдегід
- НОА – необструктивна азооспермія
- ОА – обструктивна азооспермія
- ПМ – плазматична мембрана
- ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів
- Т – тестостерон
- ТРБМ – трансмембранний регуляторний білок муковісцидозу
- ФН – фізіологічна норма
- ФСГ – фолікулостимулюючий гормон
- AZF – азооспермічний фактор
- cGMP – циклічний гуанозинмонофосфат
- cNOS – конститутивна синтаза оксиду азоту (NOS-I + NOS-III)
- iNOS (NOS-II) – індукційна ізоформа синтази оксиду азоту
- NADPH – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений
- nNOS (NOS-I) – нейрональна ізоформа синтази оксиду азоту
- NO – Нітроген (II) оксид
- (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) – нітрит-йони
- (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) – нітрат-йони
- NOS – синтаза оксиду азоту
- ONOO<sup>-</sup> – пероксинітрит
- [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> – внутрішньоклітинна концентрація йонів кальцію

GSH – глутатіон відновлений

GSSG – глутатіон окиснений

GSHt – глутатіон загальний

RI GSH – редокс-індекс глутатіону

GP, ГП – глутатіонпероксидаза

GR, ГР - глутатіонредуктаза

GT, ГТ – глутатіон-S трансфераза

ЕДТА - етилендіамінтетрацетат

P<sub>i</sub> – неорганічний фосфат

ICSI – інтрацитоплазматична інєкція сперматозоїда

ПСШ - інфекції, що передаються статевим шляхом

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Непліддя в шлюбі є важливою медико-соціальною проблемою [12, 14, 40, 48, 49, 56, 68, 102, 153, 163, 180, 224]. Кожна восьма пара має проблеми з народженням першої дитини, а кожна шоста – з народженням другої та наступної дитини [6, 41, 49, 145, 192, ]. За останні роки в Україні зафіксовано прогресивне зростання випадків чоловічого непліддя [4, 11, 14]. Найскладнішою для лікування формою чоловічого непліддя є азооспермія. Азооспермію визначають як повну відсутність сперматозоїдів в еякуляті. Залежно від характеру та причин порушення сперматогенезу азооспермію поділяють на обструктивну (екскреторну, ОА) та необструктивну (секреторну, НОА) [5, 15, 56, 84, 145, 170, 211]. При чоловічому неплідді азооспермію виявляють в 10-15% випадків, при цьому частка обструктивної та необструктивної форм складає приблизно 40 і 60 %, відповідно [56, 58, 170]. Проблемою є диференційне діагностування ОА та НОА. ОА виникає в результаті вторинної обструкції чоловічого репродуктивного тракту. Її визначають на основі комплексного вивчення анамнезу, фізикальних методів, лабораторних діагностичних тестів, а також ультразвукових і генетичних методів досліджень, та гістологічного дослідження біоптатів яєчок. НОА, що розвивається на фоні первинного чи вторинного пошкодження паренхіми яєчок, диференціюють від ОА, на основі таких ознак як консистенція та об'єм яєчок, рівень гормонів, мікроскопічне дослідження біоптатів яєчок, генетичні дослідження (каріотип, мікродилеції Y-хромосоми). Лікування ОА основане на хірургічному відновленні прохідності сім'явивідних шляхів, або екстракції сперматозоїдів із придатка яєчка чи тистикулярної тканини [20, 48, 77, 143, 144]. При НОА проводять лікування гіпогонадотропного чи нормогонадотропного гіпогонадізму, або проводять екстракцію сперматозоїдів у випадку використання програм допоміжних репродуктивних технологій. Однак, на даний час, найбільш достовірним методом діагностування азооспермії є біопсія яєчка. Вона дозволяє не тільки диференціювати екскреторну та секреторну

форми непліддя, але й визначати ступінь порушення сперматогенезу на основі гістологічної картини біоптату [7, 18, 27, 61, 75, 89, 103, 106, 124 134].

Оскільки отримання біоптатів є складним і травмуючим процесом, йде активний пошук біохімічних, генетичних, імунних маркерів азооспермії.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота є фрагментом планових науково-дослідних тем Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького «Молекулярно-генетичні, імунологічні та біохімічні фактори прогнозування урологічних захворювань», державний реєстраційний № 0118U000107 (2018-2022 роки) та «Дослідження ролі системних і паракринних регуляторних механізмів у забезпеченні гомеостатування функціонально-метаболических параметрів організму за умов адаптації до дії екстремальних чинників різної природи», державний реєстраційний № 0116U004510 (2016-2020 роки). Автор є співвиконавцем згаданих тем, ним особисто проведені клінічні та лабораторні дослідження, представлені у дисертаційній роботі. Тема дисертації затверджена вченою радою факультету післядипломної освіти (протокол № 10-18 від 23.10.2018 р.).

Комісією з питань біоетичної експертизи Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол № 4 від 22 квітня 2019 р. та протокол № 1 від 25 січня 2021 р.) порушень морально-етичних норм при виконанні дисертаційної роботи не виявлено.

**Мета роботи.** З'ясування патогенетичних особливостей непліддя чоловіків з азооспермією шляхом вивчення інструментальних, гістологічних, біохімічних і генетичних показників.

Для досягнення зазначеної мети у роботі сформульовано наступні завдання:

1. Проаналізувати параметри та функціонування яєчок чоловіків із різними формами азооспермії.
2. Провести гістологічний аналіз біоптатів яєчок чоловіків із різними формами азооспермії.

3. Оцінити концентрації статевих гормонів у пацієнтів з азооспермією.
4. Дослідити активності ензимів ряду регуляторних систем клітин (про- та антиоксидантної, аргіназо-NO-синтазної та  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-залежної) в сім'яній плазмі та крові чоловіків із різними формами азооспермії.
5. Оцінити генетичні зміни на основі каріотипування у пацієнтів з різними формами азооспермії.
6. Виокремити патогенетичні критерії порушення фертильності чоловіків із різними формами азооспермії та на основі них створити діагностичний алгоритм.

*Об'єкт дослідження:* обструктивна та необструктивна форми азооспермії у чоловіків.

*Предмет дослідження:* клінічна симптоматика, УЗД-параметри, показники еякуляту, гістологічні показники біоптатів яєчок, біохімічні та генетичні показники крові, біохімічні показники сім'яної плазми.

*Методи дослідження:* клініко-анамнестичні, загальноклінічні, інструментальні (УЗД, соноеластографія), гістологічні, біохімічні, генетичні, статистичного аналізу.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше показано зниження регуляторного індексу відновленого глутатіону в сім'яній плазмі чоловіків із НОА, що свідчить про зниження сумарної потужності антиоксидантної системи. Доведено зниження співвідношення відновленого глутатіону до окисненого, зниження співвідношення аргінази до індукцибельної ізоформи NO-синтази, зростання співвідношення метаболітів оксиду азоту - нітратів до нітритів, зростання активності індукцибельної ізоформи NO-синтази. Розширені уявлення про патогенез різних форм азооспермії та отримані нові дані щодо механізмів порушень фертильного потенціалу чоловіків з азооспермією.

На основі гістологічного аналізу тканини яєчка пацієнтів з НОА показано, що у всіх зразках наявні зміни у звивистих сім'яних каналцях, їх діаметр зменшений (гіпоплазія) щодо норми, стінки сім'яних каналців потовщені,

базальна мембрана виражено фіброзована, сперматогенез або повністю відсутній, або зупинявся на стадії сперматогоній.

Між об'ємом яєчка, концентраціями в сироватці крові інгібіна В та ФСГ, активностями аргінази та індукцибельної NO-синтази встановлені високі кореляційні зв'язки, що свідчить про патогенетичне значення цих показників.

**Практичне значення отриманих результатів.** Доведено, що ряд біохімічних показників у сім'яній плазмі (співвідношення відновленого глутатіону до окисненого, редокс-індекс відновленого глутатіону, активності індукцибельної NO-синтази, співвідношення активності аргінази до iNOS та співвідношення  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ ), зниження лінійної швидкості кровотоку в артеріях паренхіми яєчок та об'єму яєчок можуть слугувати доступними неінвазивними показниками азооспермії.

Основні результати наукових досліджень впроваджені в навчальний процес та наукову роботу кафедри урології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, кафедри урології Івано-Франківського національного університету, кафедри хірургії №1 з урологією, малоінвазивною хірургією та нейрохірургією імені професора Л.Я. Ковальчука Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського, в наукову роботу ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України» та ДУ «Інститут проблем ендокринологічної патології НАМН України імені Д.Я. Данилевського».

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом особисто виконані патентні дослідження та аналіз науково-медичної інформації за темою дисертаційної роботи. Самостійно проведено виконання клінічних і лабораторних досліджень, статистичну обробку даних. Дисертант, разом зі співавторами, проводив оцінку та узагальнення отриманих даних, написання та підготовку праць до друку. Планування досліджень, аналіз даних, їх інтерпретація та зіставлення з літературними даними, формулювання висновків здійснено за участю наукового керівника. Дисертантом особисто розроблено дизайн рукопису дисертаційної роботи.

**Апробація результатів дисертації.** Дисертаційну роботу апробовано на фаховому семінарі кафедри урології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол № 10 від 22 лютого 2021 р.). Результати досліджень та основні положення дисертації були представлені на X Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» (Тернопіль, 2017), II Белорусском биохимическом конгрессе «Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии» (Гродно, 2018), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми довкілля та здоров'я людини в умовах екологічних і соціальних змін у Європі та в Україні» (Тернопіль, 2018), XVII International congress of medical sciences (Sofia, 2018), LXI науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (Тернопіль, 2018), XI науково-практичній конференції (з міжнародною участю) «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» (Тернопіль, 2018), XX-му зїзді Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю (Київ, 2019), 6<sup>th</sup> Ukrainian congress for cell biology with international representation (Yaremche, 2019), 14<sup>th</sup> Bialystok International Medical Congress for Young Scientist (Bialystok, 2019), XII Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, 2019), XI Україно-польському симпозиумі «Актуальні питання урології» (Кам'янець-Подільський, 2019), XIII Міжнародній міждисциплінарній науково-практичній конференції «Сучасні аспекти збереження здоров'я людини» (Ужгород, 2020), XVIII Конгресі СФУЛТ (Львів, 2020).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 23 роботи, з яких 8 статей – у наукових фахових виданнях, рекомендованих МОН України (дві з них включені до міжнародної наукометричної бази «Web of Science»), 4 – у інших виданнях (одна з них включена до міжнародної наукометричної бази «Scopus») і 11 робіт у матеріалах наукових міжнародних і вітчизняних з'їздів, конгресів, конференцій.

**Структура дисертації.** Дисертація викладена на 165 сторінках друкованого тексту та включає вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів досліджень, власні дослідження, аналіз та узагальнення одержаних результатів, висновки, список використаної літератури, який містить 225 джерела (58 кирилицею і 167 латиницею). Дисертація ілюстрована 18 таблицями та 24 рисунками.



## РОЗДІЛ І

# СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА ЕТІОЛОГІЮ, ПАТОГЕНЕЗ, ДІАГНОСТИКУ ТА ЛІКУВАННЯ ІНФЕРТИЛЬНИХ ЧОЛОВІКІВ З АЗООСПЕРМІЄЮ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

### 1.1 Неплідність чоловіків – медико-соціальна проблема

На даний час неплідні шлюби є важливою медико-соціальною проблемою і це визначає підвищену увагу багатьох дослідників до питання репродуктивного здоров'я [12, 14, 40, 48, 49, 56, 68, 102, 163, 180, 224]. В Україні частота непліддя в сімейних парах достатньо висока і коливається в межах 10-15 % [12, 14, 15, 56]. За даними Американського товариства репродуктивної медицини, розповсюдженість непліддя в США складає 12 % населення репродуктивного віку [170]. Сам термін «непліддя» свідчить про відсутність настання вагітності у жінки протягом 1 року і більше в сексуально активній парі, без використання контрацептивних засобів [31, 170, 210, 211]. Раніше відсутність вагітності в парі здебільшого пов'язували із захворюваннями жіночої репродуктивної системи [186]. Однак, сучасні дані свідчать, що практично в половині випадків неплідність в шлюбі обумовлена чоловічим фактором непліддя [8, 29, 30, 48, 49]. В останні роки розповсюдженість непліддя у чоловіків в Україні, та й в усьому світі зростає [9-14, 108-111, 192].

1.2 Класифікація, етіопатогенетичні та клініко-діагностичні аспекти неплідності чоловіків при азооспермії.

Існує кілька класифікацій чоловічого непліддя, але більшість із них відображає лише окремі аспекти цієї проблеми.

Так, одна характеризує етіологічні фактори порушення сперматогенезу [51-54, 1-2, 107-111, 208]. Інші розрізняють первинне (секреторне), вторинне (екскреторне), змішане, аутоімунне, ідіопатичне непліддя [11-14, 17, 24, 48,

95, 109-111]. Секреторне непліддя характеризується впливом на тканину яєчка різних пошкоджуючих факторів, що призводить до порушення функції яєчка, зокрема порушення сперматогенезу, інгібування ендокринної функції яєчка тощо [29, 32, 34, 39, 45, 79, 93, 129, 136, 151]. В основі екскреторно-обтураційної форми непліддя є обструкція сім'явивідного каналу, але процес сперматогенезу при цьому не порушений [5]. Порушення цілісності гемато-тестикулярного бар'єру за впливу пошкоджуючих факторів призводить до розвитку аутоімунних реакцій проти сперматозоїдів, що, своєю чергою, порушує їх функціонування [108, 129]. Коли у ряді випадків не вдається встановити справжню причину непліддя, то говорять про ідіопатичне непліддя [11, 17, 85].

Отже, чоловіче непліддя – мультифакторний синдром, що включає в себе цілий ряд патологічних станів як статевої, так і екстрагенітальної сфери [4, 5, 8, 48, 97, 129, 159, 160]. Причини чоловічого непліддя прийнято поділяти на претестикулярні, тестикулярні та посттестикулярні [16, 17, 30, 192]. До претестикулярних відносять патології гіпоталамо-гіпофізарної системи, що пов'язано з дефіцитом тропних гормонів, гормонів наднирників, щитоподібної залози тощо [44, 45, 119, 142-145]. Тестикулярні фактори непліддя включають різні хромосомні аномалії (синдром Клайнфельтера, синдром Калмана, синдром нечутливості до андрогенів, мікрделеції довгого плеча Y-хромосоми тощо, які зустрічаються у 10-15 % неплідних чоловіків [190, 193, 198, 200, 201, 119, 157, 185, 204]. Окрім цього, до тестикулярних факторів відносять синдром Сертолі, синдром відсутності яєчок, крипторхізм, варикоцеле, травми яєчок, інфекційно-запальні захворювання, різні види інтоксикацій, гормональну, хіміотерапію та променеви терапію, високі температури [48, 122, 123, 174]. Посттестикулярні причини чоловічого непліддя обумовлені анатомічними, функціональними чи імунними факторами, що порушують транспорт сперматозоїдів із яєчка. Сюди входить обструкція сім'явивідних шляхів, здебільшого внаслідок

інфекційно-запальних захворювань, травм органів сечостатевої системи, вроджених причин, вазектомії тощо [8, 93, 122].

Сперматогенез – складний біологічний процес проліферації та диференціації клітин герміногенного епітелію [16-18, 48, 64, 65]. При чоловічому неплідді розрізняють наступні форми порушення сперматогенезу [4, 51, 52, 70, 85]: олігоспермія (недостатній об'єм еякуляту, менше 1,5 мл), олігозооспермія (концентрація сперматозоїдів менше 15 млн/мл), астенозооспермія (менше 32% сперматозоїдів із прогресивним рухом, або менше 40% разом активно рухливих та слаборухливих сперматозоїдів), тератозооспермія (понад 96% патологічно змінених сперматозоїдів), лейкоцитозооспермія (вміст лейкоцитів в еякуляті більше  $1,0 > 10^6$ /мл) та азооспермія (відсутність сперматозоїдів в еякуляті).

### 1.3 Діагностика типів азооспермії

Однією з найскладніших для лікування форм чоловічого непліддя є азооспермія, що характеризується повною відсутністю сперматозоїдів в еякуляті. В залежності від причин і характеру порушення сперматогенезу азооспермію більшість дослідників останнім часом поділяють на обструктивну (екскреторну) та необструктивну (секреторну) [17, 48, 144, 145, 170]. За чоловічого непліддя азооспермію серед інших патоспермій виявляють у 10-15 % пацієнтів. Доля обструктивної та необструктивної форм складає приблизно 40 % і 60 %, відповідно [48, 170]. За іншими даними, НОА є домінуючою формою патології і зустрічається у 80-90 % усіх випадків азооспермії [58, 84, 170]. Також є дані, що за результатами біопсій структура форм азооспермії наступна: обструктивна 55 %, необструктивна – 45 % [58]. При цьому основними причинами обструктивної азооспермії були інфекційно-запальні захворювання (50,7 %), післяопераційні (28,3 %) та посттравматичні (10,4 %) порушення, вроджені аномалії сім'явивідних шляхів (6 %) та кісти придатка яєчка (4,6 %). Причинами необструктивної азооспермії були вторинний гіпергонадотропний гіпогонадізм

(35,2 %), наслідки невчасно пролікованого варикоцеле (25,9 %), первинний гіпогонадизм (20,4 %), хромосомні делеції та транслокації (13 %), синдром Клайнфельтера (5,5 %) [58].

При азооспермії, на даний час, практично єдиним і достовірним методом діагностики є біопсія яєчка, яка дозволяє не тільки диференціювати секреторну та екскреторну форми непліддя, але й визначати важкість порушення сперматогенезу, виходячи із гістологічної картини біоптату [18, 30, 178, 203, 207]. Оскільки отримання біоптатів є травмуючим фактором із малим виходом матеріалу, йде пошук інших прогностичних маркерів непліддя, зокрема в крові.

При неплідді найважчою групою для лікування є пацієнти з азооспермією [29, 31, 80, 1000, 109-111, ]. Диференційна діагностика ОА та НОА є важливим етапом встановлення точного діагнозу [48, 129, 170 ]. На основі анамнезу, лабораторних тестів, фізикальних методів, генетичних досліджень та гістологічних показників біоптатів яєчок диференціюють ОА обумовлену вторинною обструкцією сім'явивідного тракту. НОА розвивається на фоні первинного чи вторинного пошкодження яєчок і її диференціюють на основі клінічних оцінок консистенції та об'єму яєчок, рівня ФСГ, генетичних досліджень (каріотипування, мікроделеції Y-хромосоми) зокрема генетичного тесту на гіпогонадотропний гіпогонадизм [168, 170, 195, 198-201 ]. Лікування ОА передбачає хірургічне відновлення прохідності сім'явивідного тракту або мікрохірургічне отримання сперматозоїдів із яєчка [18, 72, 152, 218, 225]. При НОА проводять терапію гіпогонадотропного гіпогонадизму [41, 44, 45, ], а при неефективності лікування виконують хірургічне лікування в обсязі мікро-TESE [103, 122, 124, 140, 146, 152].

Пропонуються 5 основних етапів при діагностиці та лікуванні пацієнтів з НОА [5, 6, 122, 123]. Зокрема, підтвердити зв'язок азооспермії з порушенням сперматогенезу, виключити генетичні фактори азооспермії, з'ясувати можливість покращення сперматогенезу до оперативного втручання, вибрати найбільш ефективний метод відновлення сперматогенезу та використати

найбільш сучасні лабораторії для виконання допоміжних репродуктивних технологій.

В літературі існують різні думки щодо механізмів пошкоджуючої дії різних факторів на сперматогенез. Це токсична дія, механічне стискання сім'явивідних шляхів варикозно-розширеними венами, гіпоксія сім'яників внаслідок стазу крові в венах сім'яного канатика, порушення температурного стану яєчок, пошкодження гемато-тестикулярного бар'єру та розвиток аутоімунних процесів, травми та запальні процеси [21-25]. Повідомляється також про роль пониженого продукування андрогенів клітинами Лейдіга, порушення мікроциркуляції в яєчках [17-19].

Сперматогенез є один з найбільш динамічних процесів в організмі людини, він пов'язаний з клітинною регенерацією та диференціюванням, протікає під контролем відповідних генів гамет, а також регулюється сукупністю гормонів, цитокінів і факторів росту [48, 127, 128, 162, 175, 183, 184, 195]. За добу у дорослого чоловіка продукується 100-200 млн сперматозоїдів [58]. Разом з тим в еякулят надходить значно менша кількість сперматозоїдів, ніж спочатку утворюється в сім'яних каналцях яєчка. Це обумовлено їх частковою загибеллю в самому яєчку та сім'явивідних шляхах [58].

Оцінка сперматогенезу відіграє ключову роль в діагностиці непліддя у чоловіків [15, 42, 46, 47, 71, 78, 87, 158]. Обстеження чоловіків із підозрою на непліддя починається з аналізу еякулята [87]. Так, наприклад, пацієнти з НОА мають нормальний об'єм (>1,5 мл) еякулята та нормальне значення рН (> 7,2), що свідчить про відсутність обструкції сім'явивідних каналців. Окрім того, важливо встановити гормональний статус пацієнта, для чого визначають рівень фолікулостимулюючого (ФСГ), лютеїнізуючого гормону (ЛГ), тестостерону (Т) у венозній крові [5, 30, 67, 79, 82, 138, 187, 206]. Так, при НОА, перспективним для терапії станом є гіпогонадотропний гіпогонадизм – ендокринне захворювання, що характеризується недостатністю сперматогенезу внаслідок відсутності його стимуляції гонадотропінами [5, 41, 44]. У таких пацієнтів низький рівень в крові ФСГ ЛГ та тестостерону. Таким пацієнтам, незалежно від

набутої чи вродженої форми НОА, призначають гормональну терапію препаратами гонадотропінів і у них певною мірою може відновитись сперматогенез [5, 24]. Ці пацієнти мають високий шанс на продукування сперматозоїдів, в той час як медикаментозне (гормональне) лікування чоловіків з нормогонадотропною чи гіпергонадотропною функцією гіпофізу практично неефективне [5]. Однак, у більшості пацієнтів із НОА рівень ФСГ – підвищений (> 12 МО/л), рівень ЛГ теж підвищений, або знаходиться на верхній межі норми. Низький рівень тестостерону, що спостерігається приблизно у половини пацієнтів із НОА свідчить про недостатність у функціонуванні клітин Лейдіга [5].

Хворим із гіпогонадізмом призначається гормональна терапія препаратами гонадотропінів [5]. Однак, на даний час, гормональна терапія має емпіричний характер, підбирається індивідуально, а її ефективність досягається тільки при підвищенні рівня ендogenous тестостерону [5]. Точний механізм позитивного впливу медикаментозного лікування поки що невідомий, однак, припускається, що підвищення рівня тестостерону в яєчках стимулює синтез ДНК в сперматогоніях і сперміогенез у пацієнтів із залишковою сперматогенною активністю [5]. Щодо ФСГ, то клітини Сертолі мають рецептори до нього і є об'єктом дії ФСГ. Вони синтезують андрогензв'язуючий протеїн – посередник тестостерону – і лише зв'язавшись з ним, тестостерон впливає на розвиток сперматид.

Як уже згадувалось, найефективнішим методом діагностики та можливого лікування азооспермії є тестикулярна біопсія [18, 30, 75, 115, 130, 181, 147, 194, 212]. Вона є єдиним об'єктивним методом проведення диференційної діагностики між необструктивною та обструктивною формами азооспермії. Цей метод може використовуватись як із діагностичною, так і з лікувальною метою в разі отримання сперматозоїдів у достатній кількості для проведення ICSI [5, 96, 147, 181, 191].

Спеціалісти у більшості випадків не можуть точно диференціювати причину азооспермію за допомогою ендокринологічних і генетичних методів

дослідження. Біопсія в таких випадках як метод діагностики залишається провідною, оскільки має і діагностичне, і прогностичне значення не тільки при допоміжних репродуктивних технологіях, але й при визначенні ризику розвитку пухлини яєчка [170].

За думкою багатьох авторів, біоптат повинен бути розміром із рисове зерно та містити 25-30 каналців у поперечному січенні, що важливо для морфологічного вивчення тканини яєчка та підвищення достовірності гістологічного заключення [7, 30, 31]. Деякі спеціалісти рекомендують відбирати кілька зразків тканини яєчка для успішнішого пошуку сперматозоїдів [30, 31].

При дослідженні множинних біоптатів обох яєчок у пацієнтів із ОА тільки у 2 % спостережень виявили відмінну ступінь порушення сперматогенезу між різними зразками, а у пацієнтів із НОА відмінності в зразках одного і того ж яєчка щодо порушень сперматогенезу складають 32 % [170]. При цьому відмінності між правим і лівим яєчком при ОА складають 7 %, а при НОА – 13 % [170].

Аналіз гістологічних препаратів повинен включати оцінку гістологічних змін у кожному окремому сім'яному каналці шляхом окремого підрахунку сперматогоній, сперматоцитів, сперматид, клітин Сертолі; стану базальної мембрани; стану та складу інтерстиціальної тканини [18, 31, 210]. Важливим етапом морфологічного дослідження є кількісна оцінка ступеню порушення сперматогенезу [20]. Зараз, здебільшого, використовують бальну шкалу оцінки, за якою на гістологічних препаратах підраховують долю (у відсотках) сім'яних каналців, що містять витягнуті сперматиди [16, 122, 123]. На основі цього визначають ступінь атрофії епітелію сім'яних каналців яєчка. Якщо витягнуті сперматиди виявляють у 75 % каналців і більше, то це свідчить про нормальний сперматогенез, якщо у 10-75 % - це свідчить про змішану форму атрофії епітелію сім'яних каналців, а якщо менше 10 % каналців містять витягнуті сперматиди, то діагностують виражену атрофію яєчка.

Біопсія яєчка є травматичним методом та отримати зразки тестикулярної тканини набагато складніше ніж, наприклад, зробити забір крові для досліджень.

Тому, існує потреба в пошуках інших біомаркерів сперматогенезу, зокрема у венозній крові [81, 176, 197, 201, 217, 223, 225]. Раніше таким маркером вважали ФСГ, але він залежить від функціонування гіпоталамусу, тому потрібні додаткові маркери для визначення інфертильності чоловіків [74, 79, 101]. У зв'язку з поліетіологічністю форм азооспермії є необхідність пошуку універсальних маркерів, зміна рівня яких дозволяла б визначати тактику ведення пацієнтів із порушенням фертильності та перспективність їх лікування.

Одним із таких маркерів, що дозволяє робити висновок про морфофункціональний стан паренхіми яєчка може бути гормон інгібін В, який є універсальним ростовим фактором, що належить до родини трансформуючих факторів росту  $\beta$  [19, 74, 79, 100, 128, 131, 143, 156, 195]. Активна форма цього гормону складається з  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодиниць з'єднаних дисульфідними зв'язками.

У чоловіків інгібін В циркулює у крові, тому його концентрація в сироватці крові може бути маркером на неплодність [101, 128]. Більше того, виявлений взаємозв'язок між концентрацією інгібіна В в сироватці крові та об'ємом яєчок [128]. Цей гормон селективно інгібує звільнення ФСГ із передньої долі гіпофізу та володіє паракринними властивостями в гонадах [128].

У чоловіків інгібін В виробляється у сім'яних каналцях яєчок клітинами Сертолі. Цей гормон регулює секрецію ФСГ за принципом зворотного зв'язку, пригнічуючи секрецію ФСГ в гіпофізі, коли сперматогенез достатньо стимульований [101].

Відомо, що секреція інгібіну В прямо залежить від рівня ФСГ та сперматогенезу [128]. Низька концентрація інгібіну В та високий рівень ФСГ спостерігаються у неплодних чоловіків переважно з НОА [100]. Рівень інгібіну В менше 80 пкг/мл свідчить про наявність репродуктивних проблем у чоловіка. Ці дані прямо корелюють із функцією яєчок. Концентрація інгібіну В вища у чоловіків, які не мають проблем із зачаттям [96, 100]. У пацієнтів, в яких проведена кастрація, інгібін В не виявлявся. Це строго підтверджує те, що інгібін В відображає функцію яєчок, зокрема клітин Сертолі. Існує взаємозв'язок між рівнем інгібіну В, рівнем ФСГ та функцією яєчок [19, 141, 195]. Показано, що



рівень інгібіну В в сироватці крові відображає функціональний стан сперматогенезу, оскільки приймає участь в зворотньому зв'язку гіпоталамо-гіпофізарно-тестикулярної осі [25]. Припускається, що оцінка рівня інгібіну В в сироватці крові може стати альтернативою біопсії, а також використовуватись для диференційної діагностики непліддя чоловіків [74, 79]. Дані літератури свідчать, що при нормозооспермії рівень інгібіну В в сироватці крові становить  $202,0 \pm 47,2$  пг/мл, а при азооспермії –  $61,0 \pm 78$  пг/мл [25].

#### 1.4 Морфо-функціональна характеристика сім'яників при азооспермії

Основною відмінністю між двома формами азооспермії є збереження сперматогенезу при обструкції сім'явивідних шляхів. Однак, на фоні тривалої обструкції можуть відбуватись морфофункціональні зміни в тканині яєчка, патологічні процеси, що порушують герміногенний епітелій та інші порушення сперматогенезу [30, 77, 125]. Питання збереження сперматогенезу в тканинах яєчка при обструкції сім'явивідних шляхів у літературі висвітлюється неоднозначно [48, 155]. Так, гіпотетично, при збереженості сперматогенезу ефективність пункційної біопсії повинна б складала до 100 %, однак, реально, ці цифри складають 60-90 %.

НОА обумовлена безпосереднім пошкодженням сперматогенного епітелію. Ступінь вираженості цих змін часто залежить від етіології, патогенезу, тривалості захворювання [3, 16-19]. У більшості випадків НОА супроводжується зменшенням яєчок в об'ємі, зниженням рівня інгібіну В, підвищенням рівня ФСГ [100, 101].

Етіологія НОА складна і розуміння патогенезу НОА ускладнюється ще й тим, що часто наявність конкретного етіологічного фактору в одному випадку спричиняє порушення сперматогенезу, а в іншому – ні [25].

В останні роки фактором, що спричиняє зниження фертильності чоловіків прийнято вважати гіперпродукування активних форм кисню (АФК), таких як пероксид водню, вільні радикали [28, 29, 34, 62]. Продукування АФК в

надлишкових кількостях спричиняє пошкодження сперматогенного епітелію сім'яних каналців, мембран сперматозоїдів, зниження їх рухливості та порушення запліднювальної здатності [28, 29, 34, 62]. Також АФК безпосередньо пошкоджують ДНК хромосом, ініціюють апоптоз сперматозоїдів, що призводить до непліддя [38, 64, 65, 179]. Гіперпродукування АФК також спостерігається при запаленні придаткових статевих залоз, варикоцеле, діабеті, ожирінні, курінні тощо [48, 49, 56, 62]. Виявлено, що при заплідненні яйцеклітини сперматозоїдом із пошкодженою ДНК, за допомогою ІКСІ, відбувається редукція ембріона при культивуванні [3, 64, 65].

В останні роки при вивченні етіопатогенеза розладів репродуктивної функції у чоловіків особливе значення також надається генетичним факторам [101, 104, 105, 155, 157, 167, 185, 193, 199, 201]. Хромосомні аберації, мутації окремих генів призводять до порушень у формуванні статевих органів, порушень сперматогенезу, дозрівання сперматозоїдів та їх еякуляції. За даними літератури, розповсюдженість хромосомної та генної патології серед пацієнтів із порушеною репродуктивною функцією із важкими формами патозооспермії припадає на мікрделеції AZF-локуса Y-хромосоми та мутації гена трансмембранного регулятора муковісцидозу: приблизно у 10 % хворих на НОА та у 5 % на необструктивну олігозооспермію [92, 101]. При цьому, загальна розповсюдженість мутації AZF-локуса Y-хромосоми серед чоловіків із вираженими відхиленнями показників спермограми варіюють в різних популяціях – від 1,3 до 38,1 % [92, 155]. При НОА цей середній показник завжди вищий [119]. У структурі порушень при НОА переважає синдром Клайнфельтера [155].

Регуляція сперматогенезу, дозрівання сперматозоїдів у людини відбуваються в гермінативному епітелії сім'яних каналців. В процесі ембріонального розвитку регуляція росту та проліферації стовбурових клітин сперматогенезу (СКС), а також мейотичного поділу здійснюються завдяки експресії гена SRY [69, 133, 139, 154]. СКС взаємодіючи із соматичними клітинами гонад, що розвиваються, формують тестикулярні тяжі, що пізніше

трансформуються в гоноцити. У сперматогонії гоноцити трансформуються в період препубертантного розвитку і в подальшому функціонують, продукуючи чоловічі статеві клітини.

Слід відмітити, що механізми регуляції клітинних циклів у сперматогенному епітелії людини та тварин залишаються до кінця нез'ясованими. На відміну від людини, у макак резусів виявлено 2 типи А-сперматогоніїв – темні та сірі та 4 типи В-сперматогоніїв – В1-В4 [113, 121, 135, 170]. У людини відомо лише три типи сперматогоніїв: А-темні, А-бліди та одне покоління В-сперматогоніїв. Відмінності в організації сперматогоніїв в у різних організмів не тільки в кількості чи підтипах клітин, але й в резерві стовбурових клітин, клітин попередників, чутливості до цитотоксинів, променевої терепії тощо.

У людини сперматогенез починається з поділу стовбурових клітин і закінчується формуванням зрілих сперматозоїдів. У сім'яних каналцях різні зародкові клітини групуються відповідно до стадій свого розвитку – стадії сперматогенезу. Весь процес сперматогенезу поділяється на три фази: 1) мітотична проліферація та диференціювання зародкових клітин (сперматогоніїв); 2) мейотичний поділ зародкових клітин (сперматоцитів); 3) трансформация зародкових клітин (сперматид) у зрілі сперматозоїди (сперміогенез).

Клітини сперматогонії А-типу плоділяються на два види: Ат – темні та Аб – бліди сперматогонії. Ат-клітини вважаються стовбуровими, але в нормальних умовах вони не є проліферативно активними. Однак, при різкому зменшенні кількості сперматогоніїв, наприклад, внаслідок опромінення, в Ат-клітинах запускаються мітози. На відміну від них, Аб-сперматогонії діляться і кожна клітина перетворюється у дві сперматогонії В-типу. Через міжклітинні мостики материнські та дочірні клітини зберігають між собою тісний контакт. Тетраплоїдні зародкові клітини (сперматоцити) проходять різні фази мейозу, в результаті чого утворюються гаплоїдні зародкові клітини – сперматиди. Це круглі мітотично неактивні клітини, які в процесі дозрівання тансформуються в

диференційовані сперматиди і сперматозоїди. Ці процеси включають в себе конденсацію та структурне оформлення клітинного ядра, появу джгутика і зменшення частини цитоплазми. Вихід сперматозоїдів у просвіт сім'яних каналців називається сперміацією. На процес сперміації впливають гормони, токсини, температура. Загальна протяжність диференціювання сперматогоніїв А-типу у зрілі сперматозоїди 64-72 дні.

### 1.5 Гормональна регуляція сперматогенезу

Гормональна регуляція функції яєчок, продукування андрогенів і розвиток сперматозоїдів регулюються гіпоталамусом і гіпофізом за механізмом від'ємного зворотнього зв'язку [60, 67, 138, 152, 187, 195, 200]. Гонадотропні клітини передньої долі гіпофізу продукують і секретують гонадотропіни - фолікулостимулюючий гормон і лютеїнізуючий гормон, що своєю чергою, регулюють секрецію тестостерону та сперматогенез в яєчках.

Гіпофіз — структура, що контролює функцію статевих залоз під контролем гіпоталамічного гонадотропін-релізінг гормону (ГнРГ). ГнРГ секретується періодично, викликаючи дискретну секрецію гонадотропінів. Функція гіпофізу контролюється статевими гормонами та відповідними пептидами, що мають прямий чи опосередкований гіпоталамусом вплив. Гіпоталамус і гіпофіз мають тісні анатомічні та функціональні зв'язки, що дає підставу вважати ці утворення як єдину систему.

У людини секреція ГнРГ контролюється здебільшого тестостероном, який інгібує секрецію гонадотропінів за механізмом від'ємного зворотнього зв'язку, що функціонує на обох рівнях гіпоталамічному та гіпофізарному. Ефекти тестостерону та його метаболітів у різних видах тварин відрізняються, але в цілому вони діють переважно на гіпоталамічному рівні, знижуючи частоту імпульсів ГнРГ. У той же час, естрогени тормозять секрецію гонадотропінів на рівні гіпофізу, зменшуючи амплітуду піків ФСГ та ЛГ.

ФСГ та ЛГ контролюють розвиток, дозрівання та функцію статевих залоз. Тестостерон, як головний гормон яєчок, інгібує секрецію ФСГ та ЛГ. Своєю чергою, секреція ФСГ також контролюється факторами сперматогенезу. Про це

свідчить те, що азооспермія, яка обумовлена пошкодженням сперматогенного епітелію навіть при нормальній концентрації тестостерону, супроводжується вибірковим підвищенням вмісту ФСГ у сироватці крові.

В сім'яниках ФСГ сприяє активації процесу сперматогенезу і спричиняє проліферацію клітин Сертолі та сперматогенного епітелію. ФСГ зв'язується зі специфічними рецепторами клітин Сертолі і стимулює синтез ряду протеїнів і пептидів. При стимуляції сперматогенезу ФСГ і ЛГ діють як синергісти, спричиняючи синтез протеїнів, що зв'язують тестостерон. В клітинах Лейдіга під впливом ФСГ активуються процеси утворення та збільшення кількості рецепторів до ЛГ, що підвищує їх чутливість до ЛГ, який вважається основним модулятором секреції тестостерону. Тестостерон діє на сперматогонії та первинні сперматоцити, які потім перетворюються в зрілі сперматозоїди. Своєю чергою, ФСГ контролює розвиток сперматид у зрілі сперматозоїди.

Тестостерон продукується в ячках клітинами Лейдіга і діє безпосередньо в сім'яних канальцях. Він здійснює місцеву регуляцію сперматогенезу, без якої неможливе дозрівання сперматозоїдів. Процес сперматогенезу ініціюється ФСГ та ЛГ, однак тестостерон здатен ініціювати його самостійно. Високі концентрації тестостерону за механізмом зворотнього зв'язку пригнічують секрецію гонадотропінів і знижують концентрацію сперматозоїдів.

У плазмі крові тестостерон присутній у комплексі з альбумінами або глобулінами, що зв'язують статеві гормони (АЗСГ). Показано, що у людини тільки 2 % загального тестостерону циркулює в крові у вільному вигляді, 44 % зв'язано з глобулінами, а 54 % - з альбумінами. АЗСГ виконує функцію регулятора доступності вільного тестостерону. Концентрація АЗСГ в сироватці крові знаходиться під гормональним контролем. Підвищення рівня АЗСГ призводить до зниження концентрації вільного тестостерону. Одночасно активується синтез цього гормону і продовжується доти, поки концентрація його вільної форми не досягне норми. При гіпогонадізмі рівень АЗСГ може зростати.

Для підтримання нормального функціонування тестикул і розвитку вторинних статевих ознак необхідна фізіологічна концентрація пролактину. Цей

гормон синтезується передньою долею гіпофіза та є функціональним модулятором гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної вісі. За фізіологічних умов відбувається синергічна взаємодія пролактину із тестостероном і ЛГ [41, 49, 79, 138, 142, 144, 145]. Рецептори до пролактину виявлені в епітелії сім'явивідних проток, на поверхні клітин Сертолі та клітин Лейдіга, в сперматогоніях і сперматоцитах, що свідчить про важливу роль пролактину в сперматогенезі. В клітинах Сертолі пролактин сприяє збільшенню кількості рецепторів до ФСГ. В клітинах Лейдіга необхідний для підтримання їх морфології, збільшення кількості рецепторів до ЛГ, стимуляції стероїдогенезу, продукування андрогенів. Пролактин також впливає на обмін кальцію в сперматозоїдах, забезпечуючи їх транспортування в склад еякуляту із придатків, впливає на енергетичний метаболізм в сперматозоїдах, підтримує їх нормальну рухливість, забезпечує прикріплення сперматозоїда до овоцита під час капацитації. Однак, слід відмітити, що клінічні прояви гіперпролактинемії у чоловіків не так яскраво виражені ніж у жінок, а гіпопролактинемія зустрічається рідко та проявляється здебільшого в порушенні рухливості сперматозоїдів.

Щодо естрадіолу, то понад 98 % його циркулює в сироватці крові у зв'язаному з білками стані. Тільки невелика його кількість знаходиться у вільній формі та є носієм гормональної активності. Яечко секретує естрадіол здебільшого клітинами Лейдіга та клітинами Сертолі, причому його концентрація в тестикулярній тканині в 50 разів вища, ніж у периферичній крові [187, 200]. Як при зростанні, так і зниженні концентрації естрадіолу у чоловіків порушується сперматогенез. Підвищення рівня естрадіолу призводить до гіпогонадізму.

Важливе місце в регуляції сперматогенезу займає прогестерон. Він продукується як тканиною яєчка, так і корою наднирників [68, 144, 145]. Із нього синтезується тестостерон. Тривале підвищення рівня прогестерону призводить до атрофії яєчок і, як наслідок, порушення сперматогенезу та непліддя. Безпосередньо на сперматогенез прогестерон впливає через зростання

транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  в клітину. Низька експресія рецепторів до прогестерону на сперматозоїдах призводить до порушення акросомальної реакції та непліддя.

#### 1.6 Функціонування антиоксидантної та $\text{Ca}^{2+}$ - і NO-залежних регуляторних систем клітини при неплідності

В останні роки важливим фактором, що знижує фертильність чоловіків вважають гіперпродукцію активних форм кисню (АФК) [28, 34, 62, 73, 90, 122, 125, 169]. У невеликих кількостях АФК необхідні для нормальної регуляції функції сперматозоїдів, їх дозрівання, активації, акросомної реакції, але надлишкове продукування АФК спричиняє пошкодження мембран сперматозоїдів, зниженню їх рухливості та порушенню запліднювальної здатності. АФК також безпосередньо пошкоджують ДНК хромосом та ініціюють апоптоз, що призводить до непліддя [125]. Глибокий дисбаланс між продукуванням АФК та ензимними і неензимними системами антиоксидантного захисту призводить до оксидативного стресу і це вважається однією із основних причин чоловічого непліддя.

Відомо, що гіперпродукція АФК спостерігається при запальних процесах статевих залоз, варикоцеле, діабеті, надлишковій масі тіла, курінні, інфекційних хворобах тощо [32, 57, 62, 63, 65, 73, 136]. Однак, залишається нез'ясованим як часто виникає та наскільки виражене підвищення продукування АФК при різних станах, що знижують фертильність чоловіків. Так, встановлено, що сперматозоїд із пошкодженим ДНК при заплідненні яйцеклітини за допомогою ICSI часто призводить до редукції ембріона при культивуванні [5, 64, 65].

Практично відсутні дані щодо окисно-відновного потенціалу в сім'яній плазмі при азооспермії, зокрема при необструктивній її формі [90, 122, 123]. Продемонстровано, що зростання концентрації NADPH призводить до підвищення концентрації відновленого глутатіону, а, відповідно, зниження концентрації NADPH спричиняє дефіцит відновленого глутатіону [122]. У всіх пацієнтів із азооспермією є дефіцит відновленого глутатіону [122]. Активація

NADPH-оксидази при азооспермії призводить до деградації NADPH, зниження концентрації відновленого глутатіону та зростання АФК [122].

Вважається, що продукти вільнорадикального пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) виступають біомаркерами ушкодження сперматогенезу [4, 29, 53, 73, 90, 149, 161, 160, 186]. Серед них найбільш чутливим маркером оксидативного стресу та ПОЛ є малоновий діальдегід (МДА). Це продукт окиснення поліненасичених жирних кислот. Інтенсивність перебігу вільнорадикальних реакцій у сперматозоїдах неплідних чоловіків корелює з порушеннями основних морфофункціональних характеристик сперматозоїдів. Зокрема, показано негативний кореляційний зв'язок між вмістом МДА та рухливістю сперматозоїдів у чоловіків з олігоастенозооспермією. Посилення оксидативного стресу супроводжується зростанням рівня МДА.

На відміну від сперматозоїдів, сім'яна плазма містить значну кількість антиоксидантних систем, що захищають сперматозоїди від впливу оксидативного стресу. До складу останніх входять ензимні та неензимні антиоксиданти. Багатокомпонентна антиоксидантна буферна система зупиняє ланцюгові реакції і пригнічує вільнорадикальне окиснення, перетворюючи радикали у малоактивні сполуки. Вагому роль у системі антиоксидантного захисту, знешкодженні вторинних продуктів пероксидації та інших окиснених речовин відіграє глутатіонова антипероксидна система, основними ензимами якої є глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза та глутатіон-S трансфераза [4, 53, 86, 110, 111, 137, 148, 188]. Сам глутатіон теж захищає клітини від АФК [80, 166].

Вважають, що глутатіонпероксидаза є провідним ензимом глутатіонової ланки антиоксидантного захисту, що каталізує відновлення пероксиду водню та інших органічних гідрпероксидів до води і спиртів з одночасним окисненням GSH. Внаслідок каталітичної активності GP у клітинах пероксид водню та гідрпероксиди органічних молекул відновлюються до відповідних гідроксилосполук. Цей процес відбувається шляхом використання водню відновленого глутатіону, до якого цей ензим проявляє високу спорідненість [3,



185]. Активність GP у клітинах залежить від функціонування глутатіонредуктази, яка каталізує відновлення окисненого глутатіону (GSSG) до відновленого.

Глутатіонредуктаза є NADPH-залежним ензимом, активність якого пригнічується в разі накопичення окисненої форми нуклеотиду. Імовірно, зниження глутатіонредуктазної активності також обумовлене зменшенням вмісту NADPH у сперматозоїдах. Нормальне функціонування NADPH-залежної глутатіонредуктази є дуже важливим для запобігання окисному пошкодженню біомембран, які не здатні синтезувати GSH *de novo*, і тому залежить від інтенсивності відновлення окисненого глутатіону глутатіонредуктазою та його надходження із цитозолу. За умов оксидативного стресу співвідношення GSH/GSSG швидко зменшується, в результаті чого відбувається окисне пошкодження клітин. Зниження концентрації GSH, очевидно, зумовлене дисфункцією GR, яка потребує NADPH як джерела відновних еквівалентів. GR відновлює окиснену форму глутатіону та забезпечує рециркулювання GSH. А GT каталізує кон'югацію GSH з електрофільними сполуками. Значне зменшення активності GP та GR безпосередньо пов'язане зі збільшенням рівня продуктів пероксидації ліпідів і погіршенням стану окисно-відновної рівноваги у неплодних чоловіків. Дані зміни вказують на те, що за умов патоспермії у сперматозоїдах неплодних чоловіків відбувається виснаження компенсаторних механізмів глутатіонової антиоксидантної системи. Про це свідчить пригнічення активності GP та GR.

Оксид азоту (NO) – вторинний месенджер, бере участь практично в усіх фізіологічних і біохімічних регуляторних процесах, зокрема в процесі сперматогенезу [52, 54, 91, 98, 112, 117, 118, 120, 164, 171, 173, 196, 213, 219]. Він продукується NO-синтазою з L-аргініну. Конститутивна ізоформа NO-синтази активна за фізіологічних умов. Індуцибельна ізоформа за фізіологічних умов не експресується, її експресія відбувається за різних патологічних станів. Надмірна продукція NO призводить до цитотоксичності. Лімітуючим фактором синтезу NO є біодоступність клітинного L-аргініну [118, 173].

Оскільки аргіназа та NO-синтаза конкурують за спільний субстрат, між ними функціонують взаєморегуляторні механізми. Паралельна експресія iNOS та аргінази суттєво знижує рівень продукування NO при токсичних рівнях за рахунок зниження втурсьноклітинного вмісту L-аргініну [173]. Активність аргінази демонструє негативну кореляцію з NO у сім'яній рідині [173, 219]. Твердження щодо здатності аргінази та NOS використовувати L-аргінін у якості спільного субстрату залишається контраверсійним. Оскільки L-аргінін у фізіологічних умовах основною мірою метаболізується під впливом NOS. Афіність даного ензиму до субстрату в 1000 разів вища в порівнянні з аргіназою. Зміна активності аргінази у пацієнтів зі зниженим фертильним потенціалом з часом змінює біодоступність L-аргініну для NOS, таким чином впливаючи на продукцію NO. При зниженні активності аргінази більші концентрації L-аргініну стають доступними для NOS, що в результаті призводить до зростання продукції NO. У пацієнтів зі зниженим фертильним потенціалом надпродукція NO за рахунок iNOS може пригнічувати активність аргінази, сприяючи порушенням метаболізму L-аргініну. У неплідних чоловіків констатовано збільшення концентрації у сім'яній рідині метаболітів NO, таких як пероксинітрит і нітрозотіол, що свідчить про їх можливий взаємозв'язок з порушенням якості еякуляту.

Вивільнений із ендотелію NO спричиняє вазодилатацію [91]. Така вазодилатація є ендотелійзалежною. Клітинні мембрани ендотелію містять спеціалізовані іонні канали для  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{K}^+$ , які відкриваються при зростанні тиску. При цьому, відбувається гіперполяризація ендотеліальної клітини шляхом надходження  $\text{Ca}^{2+}$ , активація NOS та відповідна генерація NO [91]. Отримані будь-яким шляхом нітрати є донорами NO, який спричиняє ендотелійнезалежну вазодилатацію [91]. NO, як вазодилатор, знижує проникність судин і синтез моноцит- та лімфоцитадгезійних молекул. NO також пригнічує агрегацію тромбоцитів, тканинне окиснення та запалення, активацію факторів тромбоутворення, клітинний ріст, проліферацію та міграцію, інгібує експресію проатерогенних і прозапальних цитокінів, сприяє фібринолізу. Локально

утворений монооксиду азоту відіграє вагому роль у кровозабезпеченні органів калитки. Ендотеліальна форма NOS у нормі проявляє свою активність у клітинах Лейдіга та судинному руслі органів калитки [120].

Унаслідок недостатнього функціонування систем антиоксидантного захисту змінюються активності аргіназо-NO-синтазної та  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем і, відповідно, концентрація оксиду азоту та  $\text{Ca}^{2+}$  у клітині, які є внутрішньоклітинними месенджерами й прямо чи опосередковано регулюють більшість клітинних функцій [91, 99, 114, 116, 132, 171, 189].

$\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФаза транспортує іони та формує на мембрані клітин електрохімічні градієнти. Їх енергія забезпечує життєдіяльність клітини і підтримання гомеостазу  $\text{Ca}^{2+}$  [99, 114, 116, 221]. Індукований  $\text{H}_2\text{O}_2$  оксидативний стрес призводить до зниження активності основних мембранних  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-залежних транспортувальних систем і токсичного підвищення концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у клітинах. У пацієнтів з астенозооспермією  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФаза активність плазматичної мембрани сперматозоїдів характеризується підвищеною афінністю до іонів  $\text{Ca}^{2+}$  під впливом  $\text{H}_2\text{O}_2$  порівняно з показниками при нормозооспермії. Зниження активності  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФаз мембран сперматозоїдів запускає каскад біохімічних реакцій, що і призводять до накопичення іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , а відтак, викликають дисфункцію сперматозоїдів.

### 1.7 Роль генетичних факторів у формуванні неплідності

В останні роки при вивченні етіопатогенеза розладів репродуктивної функції у чоловіків особливе значення надається генетичним факторам [69, 88, 101, 104, 155, 157, 185, 193, 198, 199, 201]. При цьому загальна розповсюдженість мутації серед чоловіків із вираженими відхиленнями показників спермограми варіюють в різних популяціях – від 1,3 до 38,1 % [92, 155]. При НОА цей середній показник завжди вищий [119].

Відомо, що 5-15 % чоловіків із порушеним сперматогенезом і непліддям мають хромосомні порушення. При цьому аномалії статевих хромосом

зустрічаються у 75 %, а аномалії аутосом – у 25 % [42, 133, 167]. Найрозповсюдженішими аномаліями статевих хромосом є структурні перебудови Y-хромосоми (транслокації, делеції, дуплікації, інверсії), а також порушення коріотипу (наприклад, синдром Клайнфельтера) [66, 77, 83, 92, 94, 119].

В Y-хромосомі локалізовані кілька десятків генів, що кодують диференціювання статі, формування яєчок, процес сперматогенезу. Зокрема сперматогенез контролюється «включенням» - «виключенням» відповідних генів, що відповідають за проліферацію сперматогоній, мейоз, диференціювання сперматид у зрілі сперматозоїди [185, 199, 214, 222]. У відповідних ділянках Y-хромосоми, що називаються AZF-ділянками (від англ. azoospermic factor) розташовані основні гени, які контролюють сперматогенез [101, 105, 121]. Мутації цих генів в будь-якій ділянці призводить до широкого спектру порушень сперматогенезу, від гіпосперматогенезу до азооспермії.

Високий рівень хромосомних аномалій серед неплідних чоловіків вимагає при обстеженні проводити каріотипування з аналізом AZF-ділянок Y-хромосоми [101, 105, 121, 139].

**Висновки.** Найбільш важкою формою непліддя чоловіків є необструктивна азооспермія. Проблемою залишається диференціювання обструктивної та необструктивної форм азооспермії. Літературні дані свідчать, що окрім гістологічного аналізу біоптатів яєчок, вивчення гормонального статусу необхідний пошук інших, зокрема біохімічних і генетичних показників, маркерів азооспермії, вивчення різних форм гіпогонадізму.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Об'єкт досліджень. Загальна характеристика досліджуваних груп.

Матеріалом для виконання поставлених завдань слугували результати обстеження пацієнтів із непліддям, що знаходились під спостереженням на кафедрі урології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького та Обласної консультативної поліклініки КНП ЛОР «Львівська обласна клінічна лікарня». Обстежено 119 пацієнтів із різними формами азооспермії. 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.

Контрольну групу склали 46 практично здорових чоловіків віком від 22 до 45 років (середній вік  $32,7 \pm 4,3$  роки) з нормоспермією, а 49 % з них мали дітей. Останнім виконували спермограму, а також соноеластографічні та біохімічні дослідження еякуляту та сироватки крові.

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.

В основну групу включені 119 пацієнтів з азооспермією віком 22 – 48 років (середній вік  $32,4 \pm 5,5$  років) (рис. 2.1). У всіх пацієнтів цієї групи було наявне непліддя від 1 до 9 років. Кількість пацієнтів із ОА складала 50 чоловік, а з НОА – 69. Пацієнтів із змішаною формою азооспермії в дослідженнях не враховували.

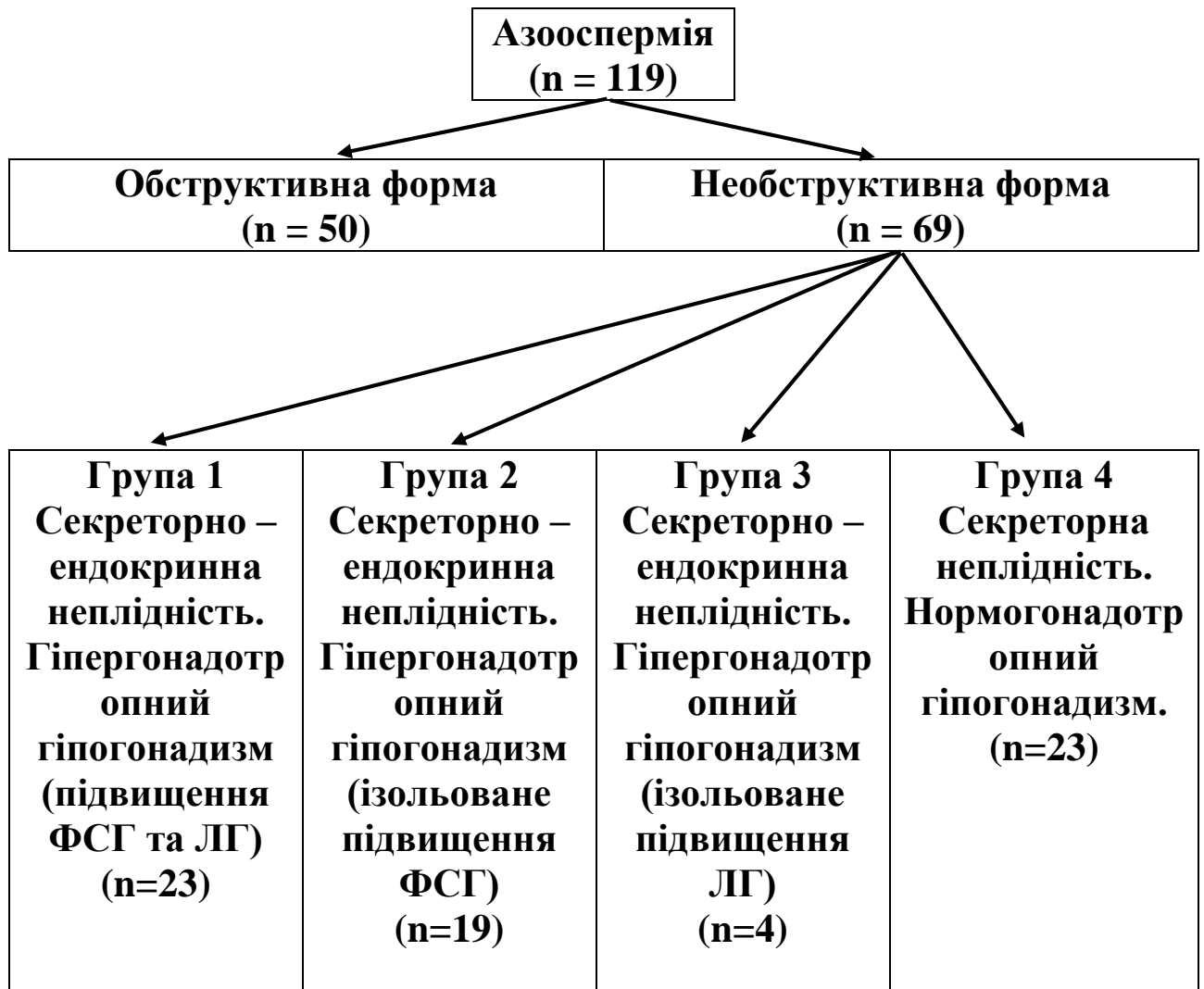


Рис. 2.1. Характеристика (розподіл) досліджуваних груп чоловіків із азооспермією.

При підборі досліджуваних груп враховувались критерії включення та виключення.

Критерії включення: репродуктивний вік пацієнтів (22-48 р.), встановлений факт непліддя, відсутність жіночого фактора непліддя в шлюбі, нормальний рівень тестостерону, відсутність гострих і хронічних інфекційно-запальних процесів в уrogenітальному тракті, відсутність ПСШ, відсутність гормональної корекції непліддя.

Критерії виключення: вік < 22 років та > 48 років, важкі загальні системні захворювання, захворювання, що потребують прийому препаратів здатних

впливати на сперматогенез зокрема гормональних препаратів, варикоцеле, наявність сперматозоїдів в еякуляті, ПСШ в анамнезі, наявність в анамнезі раніше проведеної біопсії яєчка.

Критерії азооспермії - відсутність сперматозоїдів в еякуляті або відсутність еякуляту.

Критерії обструктивної форми азооспермії – відсутність сперматозоїдів в еякуляті при збереженому сперматогенезі.

Критерії необструктивної форми азооспермії – відсутність сперматозоїдів в еякуляті через порушення процесу сперматогенезу.

Діагностика непліддя, як і інших захворювань, оснований на скаргах пацієнта, даних анамнеза, об'єктивного статусу, та на результатах спеціальних методів досліджень. Відомо, що чоловіки з непліддям, особливо з азооспермією, відносяться до складної категорії пацієнтів, через труднощі діагностики причин і ступеня порушення сперматогенезу, а також вибору методів лікування.

Всім пацієнтам були виконані наступні дослідження: спермограма, УЗД зокрема еластографію, гормони крові – ФСГ, ЛГ, загальний тестостерон, пролактин, естрадіол, інгібін В; пероксидація ліпідів, активності ензимів глутатіонової антиоксидантної системи, активності ензимів аргіназо-NO-синтазної системи, активності  $Ca^{2+}$ -АТФ-залежних гідролазних систем.

## 2.2 Загальноклінічні дослідження

Загальноклінічні дослідження включали в себе загальний аналіз крові, аналіз сечі, аналіз виділень з уретри та секрету простати. Виконувались з метою виключення гострих і хронічних запальних процесів.

## 2.3 Спермограма та аналіз еякуляту

Виконана за загальноприйнятою методикою і її параметри оцінені у відповідності з критеріями ВООЗ (2010) [4, 47, 52, 87, 208]. Спермограму виконували всім пацієнтам не менше ніж 2 рази за відсутності 3-5 – денного статевого контакту (n = 244). Еякулят оцінювали проводячи мікроскопічний

аналіз. При оцінці спермограми досліджувались наступні показники: об'єм еякулята, концентрація сперматозоїдів, загальна кількість сперматозоїдів, їх рухливість, життєздатність, морфологія, рН.

За норму були взяті наступні показники: об'єм еякулята – 2-3 мл, концентрація сперматозоїдів –  $(50,2 \pm 6,4) \cdot 10^6/\text{мл}$ , відносна рухливість –  $(52,86 \pm 3,22) \%$ , кількість патологічних форм –  $(32,8 \pm 2,8) \%$ , концентрація лейкоцитів –  $(0,28 \pm 0,06) \cdot 10^6/\text{мл}$ , рН – 7,0-7,8 [4, 52].

При аналізі еякуляту оцінювали вказані параметри і порівнювали їх із референтними значеннями морфологічних характеристик еякуляту. Оскільки хворі до втручання були під спостереженням лікарів, то і спермограму вони робили неодноразово. Для дисертаційного дослідження брали аналіз еякуляту безпосередньо перед втручанням. За результатами спермограми пацієнтів попередньо відносили або до групи порівняння (нормозооспермія), або до основної групи (азооспермія). За відсутності сперматозоїдів не менше ніж у двох спермограмах встановлювався діагноз азооспермії.

#### 2.4 Ультразвукове дослідження з доплеографією та еластографією

Стан сім'яних міхурців, простати, сонографію та доплеографію органів калитки – придатків яєчок, судин калитки проводили за допомогою УЗ-досліджень [23, 59]. Так, в нормі яєчко має овальну форму, чіткий і рівний контур, однорідну паренхіму, середню ехогенність. Білкова оболонка візуалізується як тонка неперервна полоса високої ехогенності, розташована по краю яєчка. Середостіння має вигляд гіперехогенно тонкої полоси або клина у верхніх відділах органу. На верхньому полюсі яєчка може візуалізуватися виступ діаметром 2-3 мм. Яєчко оточує невелика кількість серозної рідини, що виявляється у вигляді тонкої гіпоехогенної зони шириною 1-3 мм. Придаток яєчка розташовується при верхньому полюсі задньої пловверхні яєчка. Структура його неоднорідна і за ехогенністю аналогічна паренхімі яєчка. За відсутності



патологічних змін у придатку визначається тільки його головка, розміром 10-15 мм.

Оцінювали розміри яєчок, наявність ознак обструкції (розширення протоків яєчка та придатка), структуру яєчок, рефлюкс крові. Метод УЗД дозволяє здебільшого не тільки встановити кінцевий діагноз та оцінити стан регіональної гемодинаміки, але й провести диференційну діагностику. УЗД з допомогою кольорового доплерівського картування та доплеографії використовували для визначення об'єму яєчок гемодинамічних змін в паренхімі. Дослідження проводили на апараті Logiq 3 General Electric (США).

## 2.5 Гістологічні дослідження біоптатів яєчок

Тестикулярна біопсія є найбільш достовірним, об'єктивним методом диференційної діагностики між обструктивною та необструктивною формами азооспермії. Біпсія проводиться як з діагностичною, так і з лікувальною метою в разі отримання сперматозоїдів для допоміжних репродуктивних технологій. Виконанню біопсії передувала обов'язкова УЗ-діагностика органів калитки. Біопсію виконували методом відкритого оперативного доступу [18, 30, 103, 172]. Біоптати здебільшого брали із більш пальпаторно повноцінного яєчка, або з обох яєчок (n = 91). Частіше біопсію виконували у пацієнтів із підозрою на необструктивну форму азооспермії, оскільки є ймовірність наявності сім'яних каналців із сперматозоїдами, які можуть бути використані для лікування неплідності за допомогою ICSI (Intracytoplasmic sperm injection). Фіксували біоптати в забуференому 10 % формаліні (рН 7,2). Через 1 добу дегідратували в 70 % етанолі та заливали парафіном. Для гістологічних досліджень зрізи товщиною 5 мкм фарбували гематоксиліном та еозином. Біоптати оцінювали у відповідності з описаними раніше методиками [103, 172].

## 2.6 Гормональні дослідження

Для з'ясування причин непліддя у сироватці крові пацієнтів визначали концентрації фолікулостимулюючого гормону (ФСГ), лютеїнізуючого гормону (ЛГ), пролактину, естрадіолу, загального тестостерону, інгібіну В (n = 119). Забір крові проводився натще в період між 8-ю та 10-ю ранішніми годинами. Протягом доби виключалось фізичне та емоційне навантаження, а паління виключалось не менше ніж за три години до забору крові.

За контроль були прийняті наступні показники практично здорових чоловіків репродуктивного віку: ФСГ – 0,7-11,2 МО/л, ЛГ – 0,4-11,0 МО/л, тестостерон – 5,8-33,0 нмоль/л, естрадіол – 7,9-81,6 пг/мл, пролактин – 2,5-17,2 нг/мл, інгібін В – (202,0±47,2) пг/л [5, 15, 25]. Гормональні дослідження проведені на автоматичному імунохемілюмінісцентному аналізаторі «ADVIA Centaur XP» фірми «Siemens» на діагностичних наборах фірми «Siemens».

## 2.7 Цитогенетичні дослідження

Для отримання та аналізу хромосомного матеріалу використовували периферичну кров, взяту шляхом венопункції в стерильну пробірку з гепарином (50-100 Од гепарину на 1 мл крові). Цитогенетичний аналіз проводили на GTG-фарбованих метафазних пластинках лімфоцитів периферичної крові у відповідності до Міжнародної номенклатури хромосом людини (ISCN 2009) [55, 139]. Аналіз хромосомних препаратів проведений на мікроскопі «OLYMPUS», під масляною імерсією 7 x 90 (n = 91). Аналіз включав оцінку загальної кількості хромосом у метафазній пластинці, індивідуальну ідентифікацію хромосом за морфологічними характеристиками та диференційному забарвленню. У кожному випадку аналізували 20 метафазних пластин. Порівняння хромосом на отриманих препаратах проводили із варіантами нормального каріотипу [42].

Для вивчення мікродилецій Y-хромосоми AZF-регіону, у групі пацієнтів з азооспермією проводили виділення та очистку ДНК із лімфоцитів периферичної крові методом ферментативного розщеплення та подальшої фенольної

екстракції. Потім проводили ампліфікацію послідовностей ДНК шляхом ПЛР, використовуючи олігонуклеотидні праймери [36]. Для аналізу використовували дві мультиплексні реакції для трьох AZF-регіонів. Аналіз продуктів ПЛР здійснювали шляхом електрофорезу в 2 % агарозному гелі [36]. Для ідентифікації гена трансмембранного регуляторного білка муковісцидозу (ТРБМ) в лімфоцитах периферичної крові використовували ПЛР та відповідні олігонуклеотидні праймери. Аналіз продуктів ПЛР здійснювали шляхом електрофорезу в 2 % агарозному або полікриамідному гелі [36].

## 2.8 Біохімічні дослідження

Біохімічні показники визначалися в сім'яній плазмі, лімфоцитах і сироватці крові.

### 2.8.1 Виділення лімфоцитів периферичної крові

Для виділення лімфоцитів, забір периферичної крові у пацієнтів дослідних груп, проводили після попереднього завершення їхнього клінічного обстеження ( $n = 91$ ).

Забір крові, шляхом венепункції, проводився з ліктьової вени у вранішні години, умовах фізіологічного спокою, натще, у кількості 20 мл в пробірки, які стабілізували гепарином (кінцеве розведення 1:100).

Лімфоцити периферичної крові виділяли за методом Воупт А. [26, 33]. Кров, розведену в співвідношенні 1:1 фізіологічним розчином, нашаровували у градієнті густини фікол-тріумбразу ( $\rho = 1,08 \text{ г/см}^3$ ) й центрифугували 20 хвилин при 500 g. Зняті інтерфазні кільця моонуклеарних клітин двічі відмивали впродовж 10 хвилин фізіологічним розчином.

Після останнього центрифугування, до осаду додавали невелику кількість фізіологічного розчину, ресуспензували та, за допомогою трипанового синього, проводили підрахунок кількості живих і мертвих клітин в камері Горяєва [33].

Цілісність і життєздатність лімфоцитів крові в усіх дослідах становила не менше 95 %.

Для пермеабілізації мембран лімфоцитів крові та розкриття латентних ензиматичних активностей до суспензії додавали сапонін [4, 53, 81]. Лімфоцити крові інкубували впродовж 10 хв при помірному струшуванні у розчині, який містив сапонін у концентрації 0,2 % (оптимальна концентрація).

### 2.8.2 Оцінка стану пероксидації ліпідів за визначенням концентрації малонового діальдегіду

Принцип методу визначення МДА полягає в тому, що при високій температурі в кислому середовищі він реагує з 2-тіобарбітуровою кислотою, створюючи забарвлений триметиленовий комплекс з максимумом поглинання при  $\lambda=532$  нм [50, 186].

Оптичну густину вимірювали при  $\lambda=532$  нм проти контрольної проби. Розрахунок вмісту МДА проводили використовуючи коефіцієнт молярної екстинції  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [50].

### 2.8.3 Визначення вмісту відновленого глутатіону

Для дослідження вмісту відновленого глутатіону, використовували інкубаційне середовище ( $37^{\circ}\text{C}$ ), що містило 0,2 мл 1,5 мкМ DTNB у 0,1 М калій-фосфатному буфері (рН 7,0), 0,2 мл  $\text{H}_2\text{O}$ . У цю суміш вносили 0,1 мл суспензії лімфоцитів, перемішували та через 10 хв визначали оптичну густину при  $\lambda=412$  нм. Кількість відновленого глутатіону відображали в нмоль GSH/мг протеїну [109].

#### 2.8.4 Визначення глутатіонпероксидазної активності

Суть методу полягає у розвитку кольорової реакції з 5,5-дітіо-біс(2-нітро-бензойною кислотою (ДТНБК) з утворенням кольорового продукту тіонітрофенільного аніону (ТНФА), кількість якого прямо пропорційна кількості SH-груп, що прореагували з ДТНБК [37, 110].

Для визначення глутатіонпероксидазної активності, 0,1 мл сім'яної плазми, суспензії лімфоцитів чи сироватки крові вносили в 0,8 мл інкубаційного середовища, що готували на 0,1 М трис-НСІ буфері (рН 8,0) та містило 2 мМ ЕДТА, 12 мМ  $\text{NaN}_3$ , 4,8 мМ GSH. Після 10 хв інкубації, при 37<sup>0</sup>С, додавали 100 мкл 20 мМ гідро-пероксиду тред бутилу та інкубували ще 30 хв. Реакцію зупиняли додаванням 0,2 мл 20 % ТХО охолодженої. Проби центрифугували 10 хв при 800 g. До 50 мкл супернатанту додавали 5 мл 0,1 М трис-НСІ буферу, 50 мкл реактиву Елмана. В контрольні зразки 0,1 мл гемоліату додавали після ТХО. Через 5 хв визначали оптичну густина проб на спектрофотометрі СФ-46 при  $\lambda = 412$  нм в 1 см кюветі проти  $\text{H}_2\text{O}$ . Активність ензиму відображали в нмоль GSH/хв на 1 мг протеїну, враховуючи молярний коефіцієнт екстинції ТНФА 13,6  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

#### 2.8.5 Визначення глутатіонредуктазної активності

Глутатіонредуктазну активність в сім'яній плазмі, лімфоцитах і сироватці крові визначали спектрофотометрично при  $\lambda = 340$  нм в 0,2 М калій-фосфатному буфері (рН 7,0), що містив 2 мМ ЕДТА. На 1 мл об'єму кювети вносили 0,5 мл калій-фосфатного буферу (30<sup>0</sup>С), 50 мкл 2 мкМ NADPH, приготовленому на 10 мкМ трис-НСІ буфері (рН 7,0), 50 мкл 20 мкМ GSH. До кінцевого об'єму доводили дистильованою водою. Реакцію ініціювали додаванням до кювети 100 мкл суспензії клітин, сім'яної плазми чи сироватки крові. Час інкубації становив 10 хв. В якості контролю використовували проби без NADPH, без GSH і без субстрату. ГР-активність виражали в нмолях NADPH/хв на 1 мг протеїну,

враховуючи, що молярний коефіцієнт екстинції NADPH =  $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [86, 110].

### 2.9.6 Визначення глутатіонтрансферазної активності

Глутатіонтрансферазну активність сім'яної плазми, сироватки крові чи лімфоцитів визначали спектрофотометрично при  $\lambda=340 \text{ nm}$  в  $0,1 \text{ M}$  калій-фосфатному буфері (рН 6,5), що містив  $1 \text{ mM}$  ЕДТА  $1 \text{ mM}$  1-хлор-2,4-динітробензол,  $5 \text{ mM}$  GSH. Суспензію клітин доводили до  $0,4 \text{ mg}$  протеїну на  $1 \text{ ml}$  реакційного середовища. ГТ-активність розраховували в нмоль GSH/хв на  $1 \text{ mg}$  протеїну [111], враховуючи, що молярний коефіцієнт екстинції 1-хлор-2,4-динітробензолу =  $9,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### 2.9.7 Визначення аргіназної активності

Активність аргінази в сім'яній плазмі, сироватці крові та лімфоцитах визначали за утворенням сечовини, вміст якої вимірювали за допомогою діагностичного набору відповідно до інструкції фірми-виробника (Simko, Україна). Ензиматичну реакцію ініціювали внесенням аліквоти ( $150 \text{ mkl}$ ) протеїну в інкубаційне середовище наступного складу (мМ):  $20 \text{ Tris HCl}$ ,  $100 \text{ L-аргінін}$ ,  $2 \text{ MnCl}_2$  (рН = 9,5), об'ємом  $300 \text{ mkl}$ ; кількість протеїну у пробі –  $50 - 100 \text{ mkg/ml}$ . Інкубацію здійснювали  $30 \text{ хв}$ , при температурі  $37^{\circ} \text{ C}$  на шейкері. Реакцію зупиняли внесенням в інкубаційне середовище  $40 \text{ mkl}$  50%-ї трихлороцтової кислоти. У контрольні зразки замість протеїну вносили відповідну аліквоту фізрозчину. Крім дослідних і контрольних, проб готували також пробу, що містить стандартний розчин сечовини ( $16,65 \text{ mM}$ ). Усі зразки спектрофотометрували проти контрольних при  $\lambda=520 \text{ nm}$ . Активність аргінази обчислювали і виражали у нмолях сечовини/хв·мг загального протеїну у пробі [52].

### 2.8.8 Визначення активності $\text{Ca}^{2+}$ -залежної та $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної ізоформ NO-синтази

Визначення NO-синтазної ензиматичної активності сім'яної плазми чи сироватки крові проводили при  $37^\circ\text{C}$  у середовищі інкубації об'ємом 1,5 мл наступного складу: трис- $\text{HCl}$  – 0,08 М (pH 7,4),  $\text{CaCl}_2$  – 10 мМ, *L*-аргінін – 0,15 мМ,  $\text{NADPH}(\text{H}^+)$  – 0,12 мМ. Контрольні та безсубстратні зразки (до яких субстрат не вводили) готували аналогічно до дослідних, але вони замість  $\text{NADPH}(\text{H}^+)$  та *L*-аргініну містили бідистильовану воду. NO-синтазну реакцію ініціювали внесенням до інкубаційного середовища аліквоти протеїну (70 мкл); кількість протеїну у пробі не перевищувала 50–70 мкг/мл.

Дослідні проби спектрофотометрували проти контрольних та безсубстратних зразків при  $\lambda=340$  нм, після чого їх інкубували протягом 20 хв при  $37^\circ\text{C}$ . Реакцію зупиняли внесенням до реакційного середовища  $\text{HClO}_4$  (1,5 М) [43, 54]. Активність NO-синтази виражали в наномолях окисненого  $\text{NADPH}(\text{H}^+)/\text{хв}$  на 1 мг загального протеїну у пробі.

Активність  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної iNOS визначали аналогічно, додаючи в інкубаційне середовище селективний інгібітор індукбельної ізоформи аміногуанідин, замість  $\text{CaCl}_2$ . Активність  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної ізоформи NOS, що згідно з даними літератури, відповідає конститутивній ізоформі NOS (cNOS), розраховували, як різницю між загальною активністю NOS і активністю  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної ізоформи NOS [54].

### 2.8.9 Визначення концентрації нітрит- та нітрат-аніонів

Кількість нітрит-аніону ( $\text{NO}_2^-$ ) визначали в сім'яній плазмі в колориметричній реакції з використанням реактиву Гліса [33]. Для цього будували калібрувальну криву з використанням  $\text{NaNO}_2$ .

Кількість нітрат-аніону ( $\text{NO}_3^-$ ) визначали бруциновим методом спектрофотометрично [33]. Для цього будували калібрувальну криву з використанням  $\text{NaNO}_3$ .

### 2.8.10 Методика визначення активності $\text{Ca}^{2+}$ -активованої, $\text{Mg}^{2+}$ -залежної АТФазної активності плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму лімфоцитів периферичної крові

$\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазну активність лімфоцитів крові пацієнтів з азооспермією й осіб групи контролю визначали, реєструючи процес гідролізу АТФ за накопиченням  $P_i$  [4, 35, 36]. Визначення загальної  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності лімфоцитів крові проводили при 37 °С в інкубаційному середовищі (об'єм – 1 мл) такого складу (мМ): 150 КСl; 0,05  $\text{CaCl}_2$ ; 5  $\text{MgCl}_2$ ; 5 АТФ; 1  $\text{NaN}_3$  (інгібітор мітохондріальної АТФази); 1 оубаїн (інгібітор  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази); 20 Нерес-Трис-буфер (рН = 7,4) [35, 116].

Для розділення загальної  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності на компоненти: тапсигаргін-нечутливу  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазу плазматичної мембрани і тапсигаргін-чутливу  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазу мембран ЕПР до стандартного  $\text{Ca}^{2+}$ - та  $\text{Mg}^{2+}$ -вмісного середовища інкубації додавали інгібітор  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази ЕПР – тапсигаргін (0,1 мкМ). Активність “базальної”  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної,  $\text{Mg}^{2+}$ -залежної АТФази лімфоцитів крові визначали за тих же умов, але за відсутності  $\text{CaCl}_2$  і з додаванням 1 мМ EGTA та 0,1 мкМ тапсигаргіну [35, 116].

$\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазу плазматичної мембрани розраховували як різницю між  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазною активністю в присутності тапсигаргіну та “базальною”  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежною,  $\text{Mg}^{2+}$ -залежною АТФазною активністю.

$\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазу мембран ЕПР оцінювали як різницю між загальною  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазною активністю і  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазною активністю в присутності тапсигаргіну.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазну активність виражали в мкмольх  $P_i$  у перерахунку за хв на 1 мг протеїну [35, 116].

### 2.8.11 Визначення кількості неорганічного фосфату

Після зупинки ензиматичної реакції “стоп-розчином” суспензію



центрифугували (10 хв, 1500 g) і в отриманому супернатанті, який не містив протеїну, визначали вміст неорганічного фосфору  $P_i$  [35].

Метод базується на колориметричному визначенні кількості  $P_i$ , який утворюється в результаті ензиматичної реакції гідролізу АТФ. Фосфорна кислота здатна утворювати з молібденовою кислотою комплексну сполуку, яка легко відновлюється хлоридом олова ( $\text{SnCl}_2$ ) з утворенням забарвленої в синій колір молібденової сині. До проб додавали 50 мкл 0,2 % розчину амоній молібдату, перемішували та додавали 100 мкл 6,75 мМ хлориду олова. Для розвитку забарвлення проби інкубували протягом 20 хв при кімнатній температурі. Вимірювання абсорбції проводили на однопроменевому спектрофотометрії СФ-46 при довжині хвилі  $\lambda = 660$  нм. [35].

Визначення вмісту  $P_i$  проводили за калібрувальним графіком, для побудови якого використовували розчини однозаміщеного ортофосфату калію різної концентрації.

#### 2.8.12 Визначення концентрації протеїну

Вміст протеїну в сім'яній плазмі, сироватці крові чи лімфоцитарній суміші визначали за модифікованим методом Лоурі [33], який базується на вимірюванні інтенсивності забарвлення розчину внаслідок проходження двох біохімічних реакцій: біуретової та реакції реактиву Фоліна. Вимірювання абсорбції проводили на однопроменевому спектрофотометрії СФ-46 при довжині хвилі  $\lambda = 750$  нм. Значення концентрації протеїну знаходили по калібрувальному графіку. В якості етанолу використовували бичачий сироватковий альбумін (Sigma, США) [33].

#### 2.9 Статистична обробка даних

Варіаційно-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів *Microsoft Excel*. Визначали такі основні статистичні показники, як середнє арифметичне значення ( $M$ ),

стандартну похибку ( $m$ ) та середнє квадратичне відхилення ( $\sigma$ ). Достовірність змін встановлювали за  $t$ -критерієм Стьюдента. Критичні рівні достовірності при перевірці статистичних гіпотез у дослідженнях брали рівними 0,95, 0,99 та 0,999.

Результати представлені як середнє арифметичне ( $M$ )  $\pm$  стандартна похибка середнього ( $m$ ). Кількість дослідів ( $n$ ) відповідає кількості осіб, досліджених у кожному випадку (кожен раз використовували лімфоцити крові від одного пацієнта або практично здорового донора).

Рівняння прямої лінії, що найкраще апроксимує еспериментальні дані, розраховували із використанням методу найменших квадратів. Абсолютне значення коефіцієнта кореляції  $r$  становило 0,90 – 0,98. Достовірність розрахованих параметрів прямої перевіряли за  $F$ -критерієм Фішера: достовірною вважали апроксимацію за якої  $p \leq 0,05$  [47, 51].

### РОЗДІЛ 3

## ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕНЬ ПАЦІЄНТІВ З АЗОСПЕРМІЄЮ

### 3.1 Клінічна характеристика чоловіків із різними формами азооспермії

Вік пацієнтів, яким проводили клініко-діагностичні дослідження та біопсію яєчок варіював в межах 22 – 48 років. Середній вік хворих із приводу тестикулярної (секреторної) неплідності чоловіків склав 28,6 років, а з приводу посттестикулярної (екскреторної) – 31,5 років (рис. 3.1).

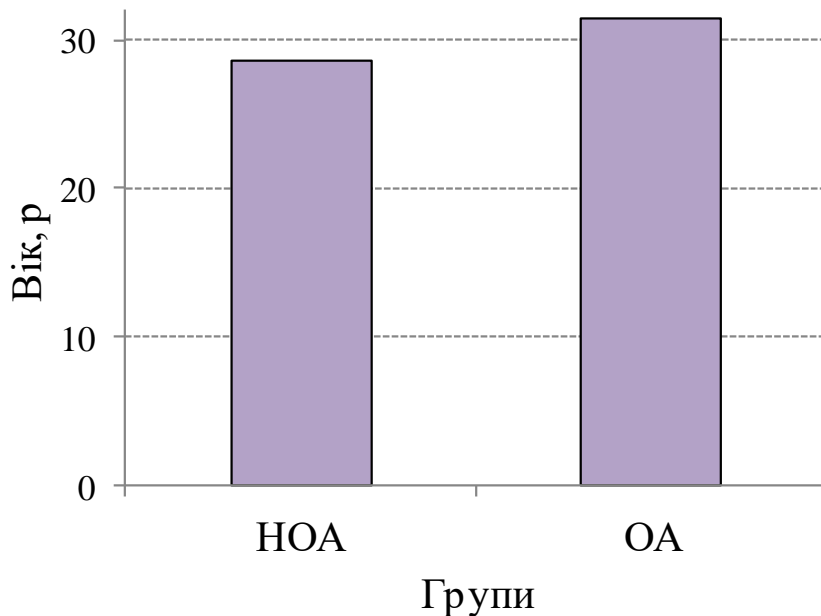


Рис. 3.1. Середній вік пацієнтів.

Середній термін неплідності склав 4,2 років. Це свідчить про тривалий шлях пацієнта до лікаря-спеціаліста та ймовірне його ненобґрунтоване лікування на поліклінічному рівні без чітко встановленого діагнозу.

Серед 119 обстеженого пацієнта з азооспермією у 69 (58,0 %)

діагностовано секреторну неплідність. У 50 (42,0 %) хворих констатовано наявність сперматогенезу при екскреторно-обтураційній неплідності (рис. 3.2).

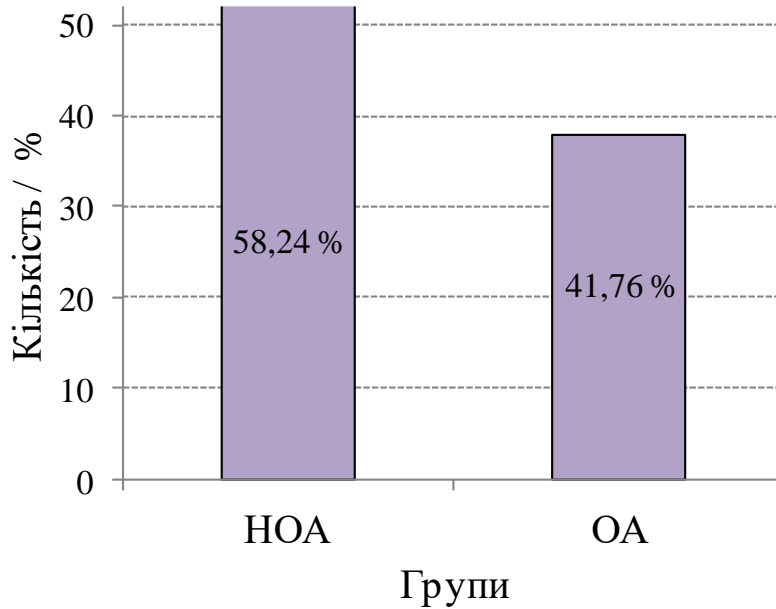


Рис. 3.2. Кількість пацієнтів з азооспермією.

Серед 69 хворих із секреторною формою неплідності у 23 виявлено азооспермію при 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) (рис. 3.3).

У 46 (66,6 %) пацієнтів спостерігалась азооспермія при відсутності сперматозоїдів, однак за наявності клітин попередників сперматогенезу.

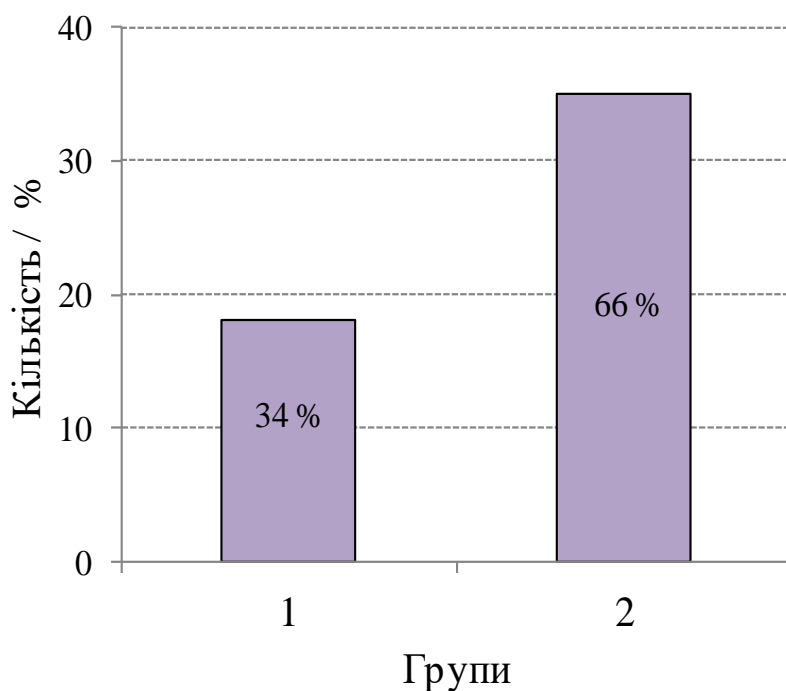


Рис. 3.3. Розподіл пацієнтів із секреторною формою необструктивної азооспермії

У восьми (11,6 %) пацієнтів із 69 (група 1) діагностовані супутні захворювання (табл. 3.1). Бачимо, що зустрічається артеріальна гіпертензія, захворювання шлунково-кишкового тракту, печінки, нирок. Спадкових захворювань в обстежених пацієнтів не було виявлено.

Таблиця 3.1  
Частота екстрагенітальної патології в обстежених пацієнтів із НОА

Супутні захворювання	Кількість хворих	
	абс.	% від усіх пацієнтів
Хронічний гастрит, виразка шлунка	2	2,9
Хронічний пієлонефрит	1	1,4
Захворювання печінки	1	1,4
Артеріальна гіпертензія	4	5,8

Вірусний орхіт переніс один (4,3 %) хворий, один (4,3 %) мав операцію з приводу флегмони калитки, троє (13,0 %) хворіли на невірусний епідидиміт, четверо перенесли двобічну орхопексію в ранньому віці.

Біль різної інтенсивності виявлено у 6,7 % хворих, у 7,6 % виявлено різну ступінь гіпоплазії яєчок, у 13,4 % – дизурію, епідидиміт в анамнезі – 8,4; епідемічний паротит в анамнезі – 6,7; у 12,6 % - депресивний стан, неспокій, розлади сну, а у 21,0 % еректильну дисфункцію (табл. 3.2).

За даними клінічного обстеження та УЗД у 19,2 % пацієнтів запідозрено хронічний простатит. У 15 (13,2%) пацієнтів виявили збільшення кількості лейкоцитів у крові.

Таблиця 3.2

## Частота клінічних симптомів у всіх обстежених пацієнтів

Клінічна симптоматика	Кількість хворих	
	Абс.	%
Біль різної інтенсивності в ділянці зовнішніх статевих органів	8	6,7
Гіпоплазія яєчок	9	7,6
Епідидиміт в анамнезі	10	8,4
Епідемічний паротит в анамнезі	8	6,7
Дизурія в анамнезі	16	13,4
Депресивний стан, неспокій, розлади сну	15	12,6
Еректильна дисфункція	25	21,0

### 3.1.1 Результати інструментальних методів досліджень

За даними УЗД у 44 (95,7 %) пацієнтів із нормозооспермією розміри яєчок були в нормі. У 72 (60,5 %) пацієнтів з азооспермією розміри яєчок були в нормі, а в 47 (39,5 %) були зменшеними (табл. 3.3).

Об'єм яєчок визначали за допомогою орхідометра та уточнювали за даними УЗД. Мікрокальцинати виявлені у 2 (4,3 %) пацієнтів з із нормозооспермією та у 39 (32,8 %) у пацієнтів із азооспермією.

Нормальні розміри яєчок коливаються в межах 15 – 30 см<sup>3</sup>. Отримані дані свідчать про те, що у пацієнтів з азооспермією за відсутності сперматогенезу наявні достовірні зміни як розмірів яєчок так і їх ехогенність.

Таблиця 3.3

Дані ультразвукового дослідження яєчок пацієнтів із азооспермією

УЗД-показники	Групи			
	Нормозооспермія (n = 46)		Азооспермія (n = 119)	
	абс.	%	абс.	%
Розміри яєчок:				
- нормальні	44	95,7	72	60,5*
- зменшені	2	4,3	47	39,5*
Ехогенність:				
- нормальна	35	76,1	28	23,5*
- підвищена	3	6,5	29	24,4*
- понижена	3	6,5	25	21,0*
- неоднорідна	5	10,9	37	31,1*
Мікрокальцинати	2	4,3	36	30,3*

Примітка: \*p<0,01 в порівнянні з нормозооспермією

За даними УЗД, об'єм яєчок у контрольній групі в середньому складав  $22,3 \pm 2,1 \text{ см}^3$ , при варіюванні від 18,3 до 25,1  $\text{см}^3$ . У групі з азооспермією об'єм яєчок в середньому складав  $16,7 \pm 1,7 \text{ см}^3$  і варіював від 8,2 до 21,1  $\text{см}^3$  (рис. 3.4).

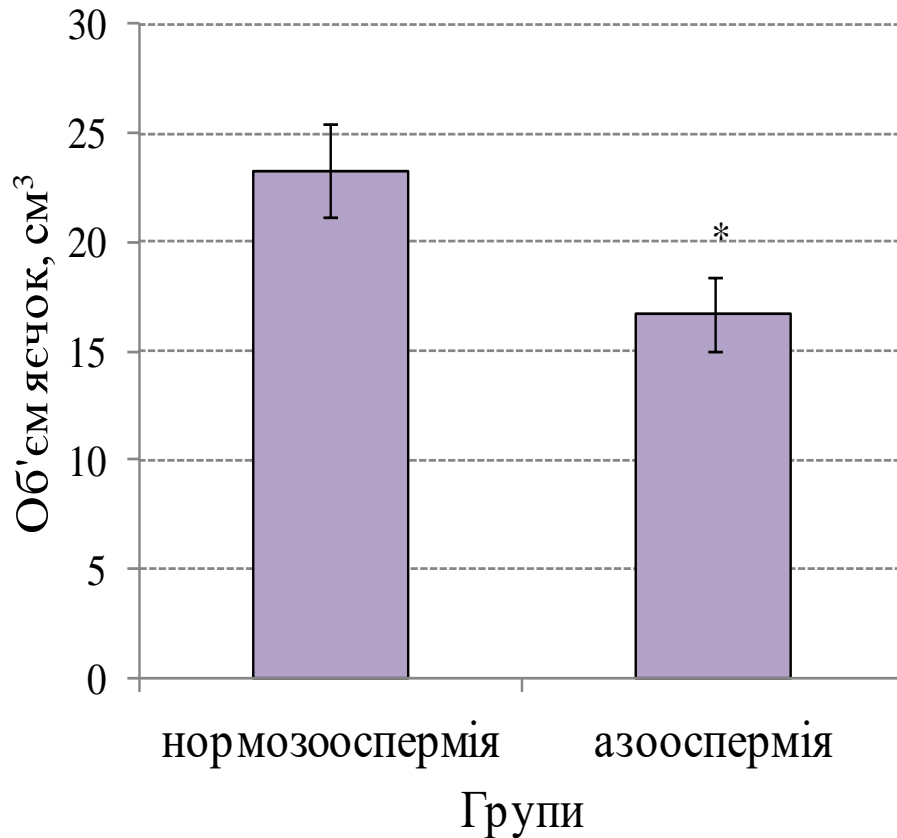


Рис. 3.4. Об'єм яєчок інfertильних чоловіків з азооспермією

Примітка: \*  $p < 0,01$  в порівнянні з нормозооспермією.

Наводимо обстеження пацієнта з обструктивною формою азооспермії, віком 29 років (рис. 3.5). Констатовано: праве яєчко розмірами 40x19x26 мм, об'ємом 10,5  $\text{см}^3$ , ліве яєчко – 34x25x18 мм, об'ємом 8,2  $\text{см}^3$ . Структурно дещо неоднорідні, ехогенність підвищена. Визначається ектазія виносних каналців. Еластографічно яєчка значно зниженої еластичності. Придатки з обох боків не збільшені. Контур їх чіткий, нерівний. В калитці звичайна кількість вільної рідини. Висновок: дифузні зміни в обох яєчках, ймовірно зміни обтураційного характеру.



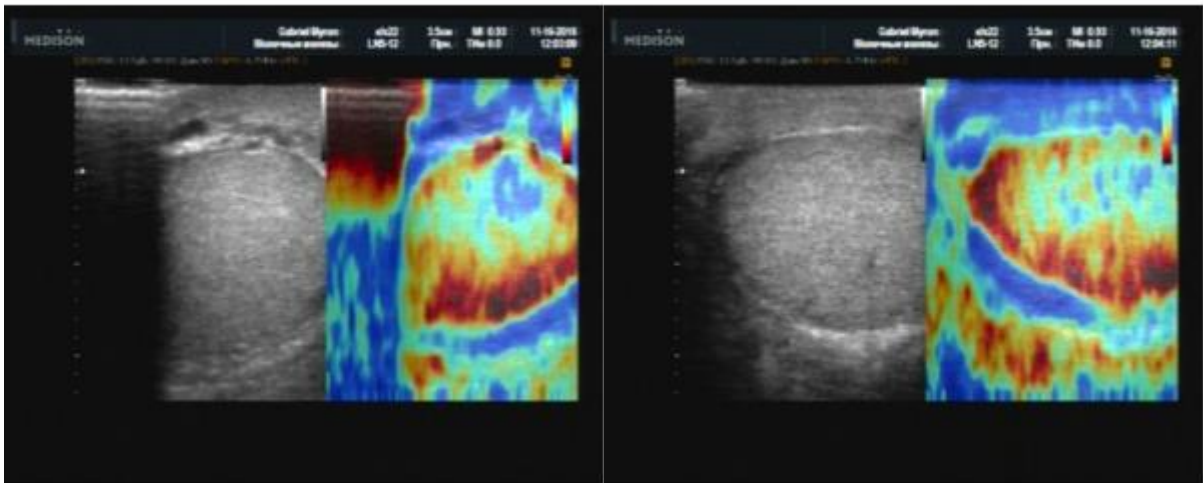


Рис. 3.5. Ультразвукове дослідження з доплерографією та еластографією правого та лівого яєчок пацієнта з обструктивною формою азооспермії

Наводимо інший приклад обстеження пацієнта з необструктивною формою азооспермії, віком 31 рік (рис. 3.6). Праве яєчко розташоване в калитці типово. Контури чіткі, рівні, розміри 47x27x27 мм, об'ємом 18 см<sup>3</sup>. Ехогенність підвищена. Дифузно визначається розширення вен сім'яного канатика. Ліве яєчко розташоване типово, контури чіткі, рівні. Розміри 37x25x28 мм, об'ємом 13,5 см<sup>3</sup>. Гіпоплазія лівого яєчка. Ехогенність підвищена. Вени сім'яного канатика помірно розширені. В калитці звичайна кількість вільної рідини. За

даними еластографії еластичність яєчок вище норми. Запідозрюються необтураційні процеси в яєчках.

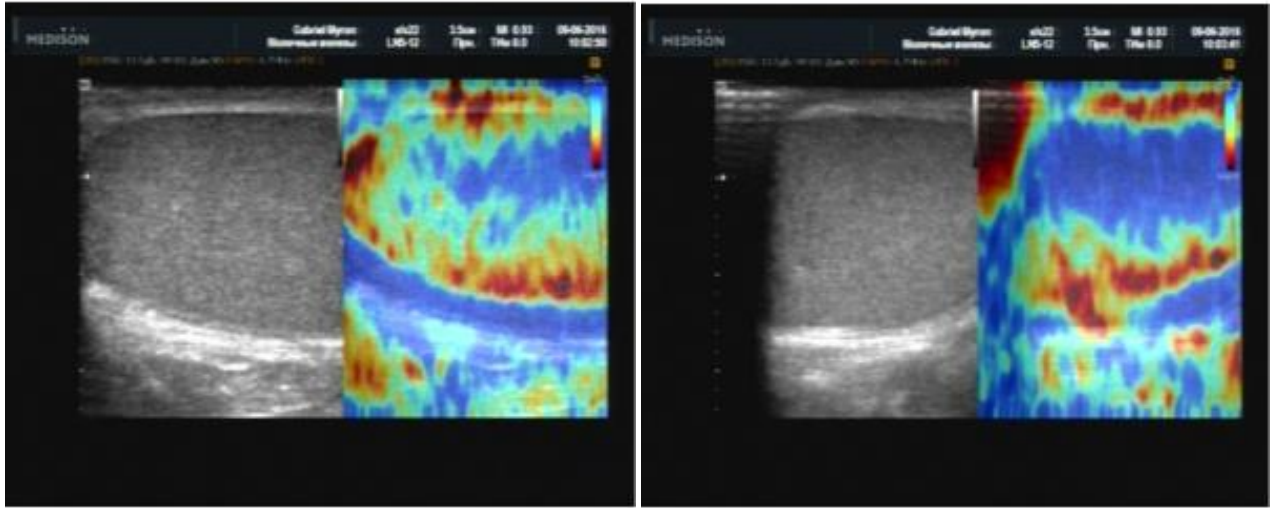


Рис. 3.6. Ультразвукове дослідження з доплерографією та еластографією правого та лівого яєчок пацієнта з необструктивною формою азооспермії

Аналіз різних груп пацієнтів із необструктивною формою азооспермії показав, що серед 23 чоловіків (група 1) із первинним гіпергонадотропним гіпогонадизмом (підвищення рівнів ФСГ та ЛГ) – 4 (17,5 %) зі слів 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 неврусний орхоепідиміт. 14 інших пацієнтів (60,9 %) будь-які фактори, що б могли негативно вплинути на плідність, заперечують. У всіх 23 пацієнтів яєчка пальпаторно були гіпоплазовані (від 18 до 37 мм).

Важливе діагностичне значення мають гемодинамічні показники паренхіматозного кровотоку яєчок в інфертильних чоловіків, що отримані за допомогою ультразвукової доплерографії. Середнє значення лінійної швидкості кровотоку (ЛШК) в артеріях паренхіми у чоловіків із нормозооспермією справа складало  $0,107 \pm 0,015$  см/с, а зліва —  $0,103 \pm 0,012$  м/с.

При азооспермії середнє значення ЛШК справа складало  $0,086 \pm 0,012$  м/с, а зліва —  $0,084 \pm 0,008$  м/с (рис. 3.7).

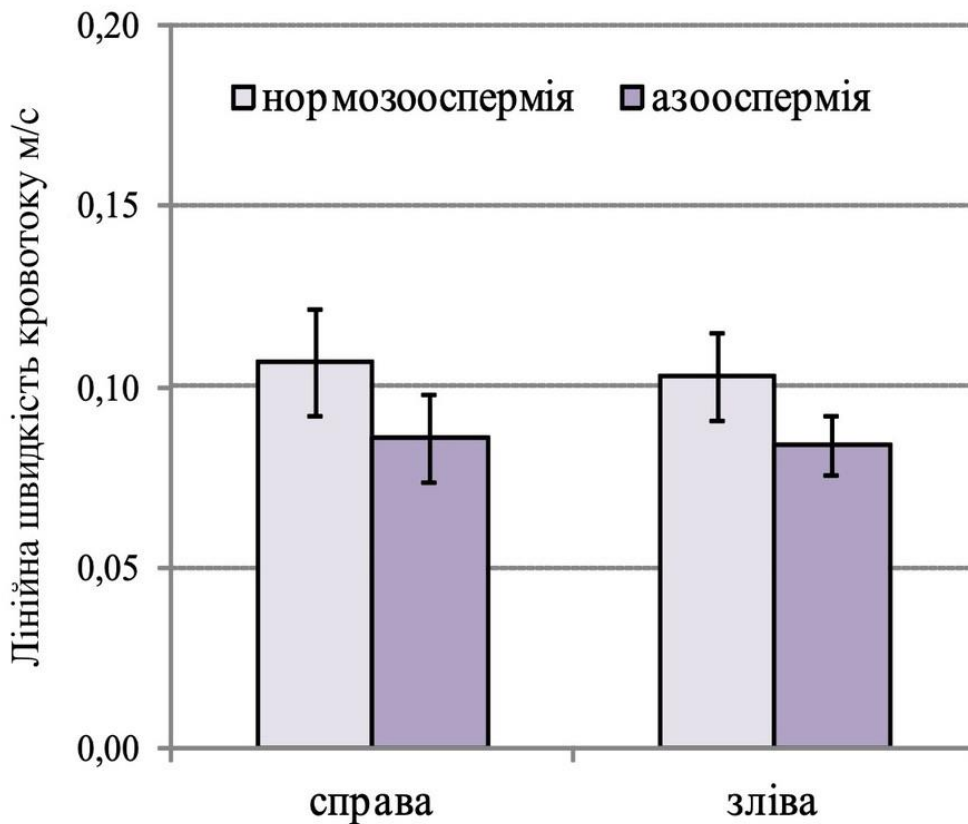


Рис. 3.7. Середні значення лінійної швидкості кровотоку в артеріях паренхіми яєчок у чоловіків з азооспермією

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 ( $p < 0,01$ ).

### 3.1.2 Результати лабораторних методів досліджень

У всіх 69 пацієнтів секреторної групи були скарги на відсутність вагітності у дружини понад один рік. При діагностуванні чоловічого неплоддя базовим дослідженням є спермограма, хоча вона і не дає розуміння причин порушення

сперматогенезу. За результатами спермограми та інших методів діагностики була виявлена необструктивна форма азооспермії. Анамнез життя пацієнтів не був обтяженим, доводилась відсутність травм, епідемічного паротиту, хірургічних втручань на статевих органах. При ультразвуковому дослідженні органів калитки структурної патології не виявлено. Вени правого та лівого сім'яного канатика були діаметром 2 мм, без ознак порушення кровотоку.

Сперму кожен пацієнт здавав двічі з інтервалом два тижні. Всім пацієнтам дослідної групи на основі обстеження та заключення спермограм було констатовано повну відсутність сперматозоїдів в еякуляті, що свідчить про наявність необструктивної форми азооспермії (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Результати спермограми пацієнтів із необструктивною формою азооспермії

Показник	Значення
	Азооспермія
Об'єм еякуляту, мл	$\leq 1.5$
pH	$7,2 \pm 0,5$
Загальна кількість сперматозоїдів, млн	не виявлено
Концентрація сперматозоїдів, млн/мл	-
Загальна рухливість сперматозоїдів, %	-
Сперматозоїди з прогресивним рухом, %	-
Кількість патологічних форм, %	-
Концентрація лейкоцитів, млн/мл	$\leq$ млн/мл

При гістологічному дослідженні тканини яєчка пацієнтів з азооспермією у всіх зразках виявлено зміни у звивистих сім'яних каналцях. Їх діаметр був у 1,5-

2,0 раза меншим щодо норми (гіпоплазія). Стінки сім'яних каналців були потовщені (гіаліноз), а базальна мембрана була виражено фіброзована.

Таким чином, показано, що серед обстежених нами пацієнтів у 58,0 % була діагностована необструктивна форма азооспермії, а у 42,0 % - обструктивна форма. За даними УЗД об'єм яєчок у пацієнтів з азооспермією був в середньому в 1,3 раза меншим щодо нормозооспермії. Дослідження гемодинамічних показників паренхіматозного кровотоку яєчок інфертильних чоловіків за допомогою ультразвукової доплерографії показали, що середнє значення лінійної швидкості кровотоку в артеріях паренхіми яєчок в 1,2 разів нижчі ніж при нормозооспермії. Гістологічні дослідження тканини яєчка пацієнтів з НОА виявили зміни в сім'яних каналцях, їх гіалінох і фіброз. Для кращого розуміння морфологічних змін в яєчках необхідні більш детальні дослідження їх біоптатів.

Матеріали до даного розділу представлені в публікаціях:

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.
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.

## РОЗДІЛ 4

### МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА СІМ'ЯНИКІВ ПРИ АЗООСПЕРМІЇ

Як уже відзначалось, найефективнішим методом діагностики та складовою можливого лікування азооспермії є тестикулярна біопсія [7, 30, 103, 140]. Вона є єдиним об'єктивним методом проведення диференційної діагностики між необструктивною та обструктивною формами азооспермії. Цей метод може використовуватись як із діагностичною, так і з лікувальною метою в разі отримання сперматозоїдів у достатній кількості для проведення ICSI [106, 135, 147].

Для оцінки тестикулярної тканини проводять біопсію яєчка, визначають стадію сперматогенезу, виявляють ознаки обструкції сім'явивідних шляхів, оцінюють можливість отримання матеріалу для виконання програми ICSI [106, 135, 147, 181, 203, 207].

#### 4.1 Морфо-функціональна характеристика біоптатів яєчок при необструктивній формі азооспермії

У першій групі досліджень, у всіх пацієнтів із НОА (n = 28) біопсію проводили з одного боку, за різних розмірів і консистенції яєчок, однак із пальпаторно більш повноцінного яєчка.

Гістологічний аналіз біоптатів яєчок 8 пацієнтів (28,7 %) із необструктивною формою азооспермії показав (рис. 4.1): набряк строми яєчка, деструктивні зміни тестостерон-продукуючих клітин, порушення структури синцитіальних комплексів сперматогенного епітелію та повну відсутність процесу сперматогенезу в окремих звивистих сім'яних каналцях, відсутність контактів між суспендоцитами (порушення структури гемато-тестикулярного бар'єру), у просвітах судин еритроцитарні складжі (порушення мікроциркуляції крові).

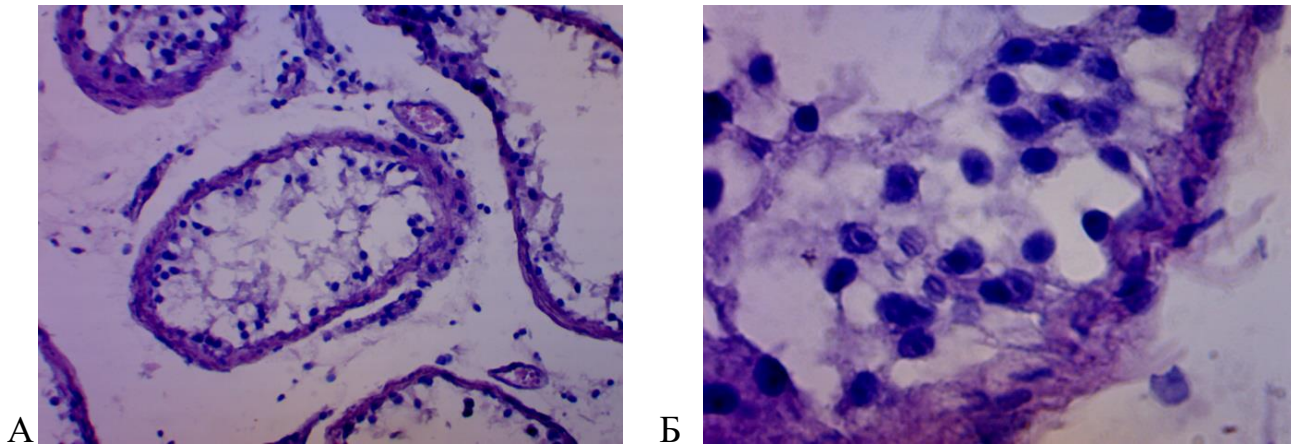


Рис. 4.1. Морфологія яєчка. Забарвлення гематоксиліном та еозином. А - зб. х 300, Б - зб. х 600.

У інших 12 пацієнтів (42,8 %) (рис. 4.2) спостерігались фіброз строми яєчка, набряк строми, витончення стінки звивистих сім'яних канальців, порушення структури синцитіальних комплексів сперматогенного епітелію, проліферацію стінки звивистих сім'яних канальців у їх просвіт, інфільтрацію лімфоцитами строми яєчка.

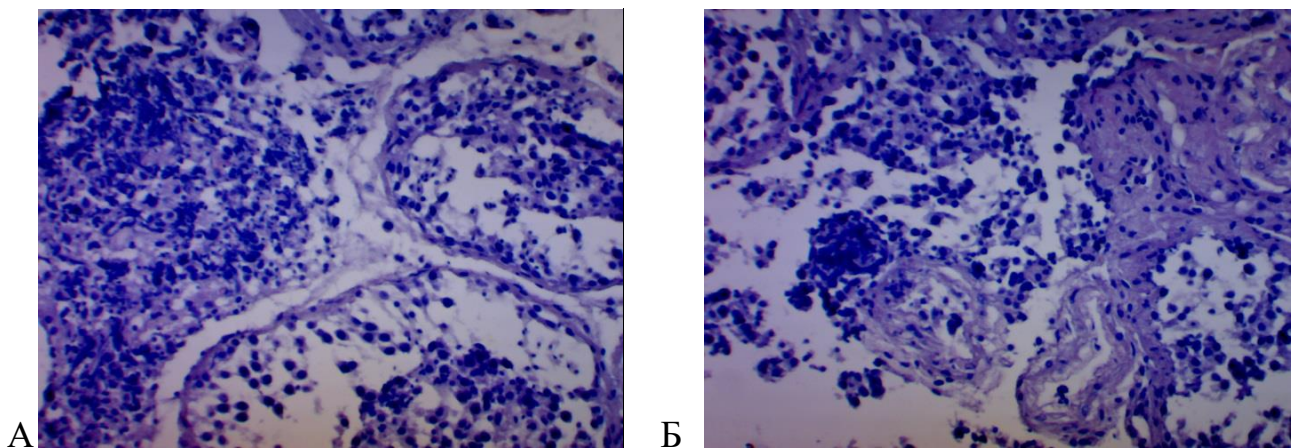


Рис. 4.2. Морфологія яєчка хворого. Забарвлення гематоксиліном та еозином. А і Б - зб. х 300.

Також, у 5 пацієнтів (17,8 %) спостерігались деструктивні зміни звивистих сім'яних канальців, потовщення стінки звивистих сім'яних канальців, проліферація стінки у просвіт канальця та інфільтрація лімфоцитами, відсутність сперматогенних клітин у просвітах звивистих канальців. У 3 пацієнтів (10,7 %) були наявні фіброз строми яєчка та інфільтрація лімфоцитами, проліферація

стінки яєчка у просвіт звивистих сім'яних каналців, відсутність сперматогенного епітелію у просвітах звивистих сім'яних каналців.

У другій групі досліджень, при аналізі конкретних біоптатів 23 пацієнтів із тотальним гіпергонадотропним гіпогонадизмом, виявлено, що в чотирьох (17,4 %) чоловіків з вірусним орхітом в анамнезі в гістологічному заключенні зазначено – стінка всіх каналців потовщена та склерована, їхній просвіт звужений, клітини сперматогенезу та клітини Сертолі відсутні, в інтерстиції – виражений фіброз (рис. 4.3).

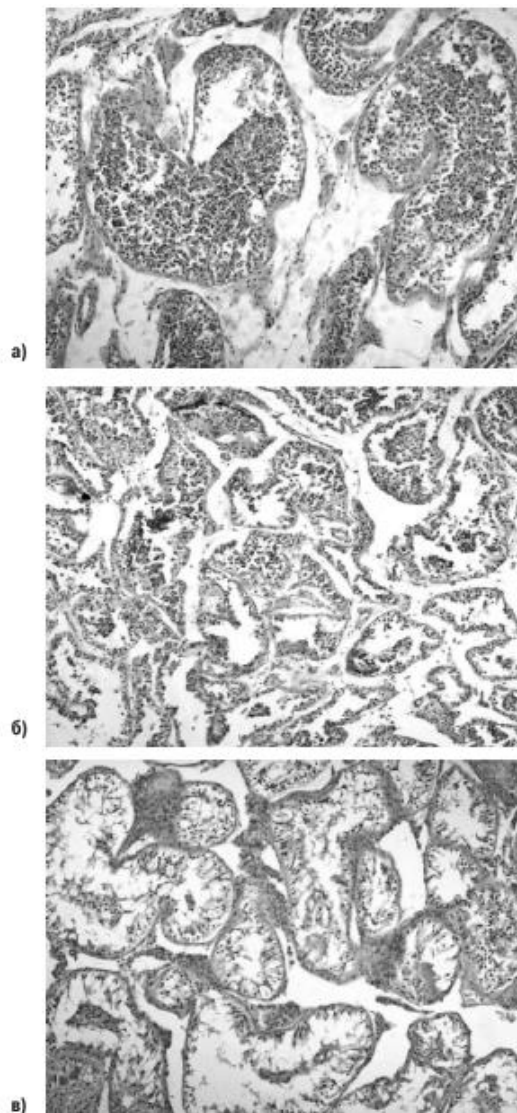


Рис. 4.3. Гістологічні варіанти біоптатів яєчок, зб. х 100:

а – збережений сперматогенез. Обтураційна неплідність; б – аплазія гермінальних клітин з фокальним неповним сперматогенезом (зупинкою дозрівання); в – аплазія герміногенних клітин.



У 14 пацієнтів (60,9 %) групи 1 (табл. 4.1) гістологічний аналіз виявив, що майже в усіх каналцях наявний лише один клітинний ряд, побудований із витягнутих перпендикулярно до базальної мембрани клітин Сертолі, які розташовані паралельно одна до одної. Просвіт каналців порожній. Лише в поодиноких каналцях наявна невелика кількість герміногенних клітин, представлених здебільшого сперматогоніями. Просвіт цих каналців також порожній.

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

У двох (8,7 %) пацієнтів без обтяженого андрологічного анамнезу в біоптатах виявлено лише один клітинний ряд, побудований із витягнутих перпендикулярно до базальної мембрани клітин Сертолі, розташованих паралельно одна одній. Просвіт цих каналців практично порожній. В частині каналців визначається зменшена рядність герміногенних клітин, представлених здебільшого сперматогоніями. У деяких каналцях рядність клітин більша, в них виявляються клітини ранніх стадій сперматогенезу, переважно сперматогонії, але виявляються і сперматоцити. Клітин пізніх стадій сперматогенезу та зрілих сперматозоїдів у просвіті каналців не виявляється. В одного (4,3 %) пацієнта після орхоепідидиміту в анамнезі у більшості каналців виявляється зменшена рядність герміногенних клітин, серед яких переважають сперматогонії, але виявляються і сперматоцити, і невелика кількість сперматидів. У просвіті цих каналців знаходяться групи клітин із дегенеративними змінами. Зрілі сперматозоїди в просвіті каналців не виявляються. В частині каналців ідентифікується лише один клітинний ряд, побудований із витягнутих паралельно до базальної мембрани клітин Сертолі, що розташовані паралельно одна до одної. Просвіт цих каналців практично порожній. Морфологічних ознак запального процесу в даних біоптатах не виявлено. В інтерстиції визначаються групи клітин Лейдіга.

Таблиця 4.1

Гістологічна картина біоптатів яєчок у пацієнтів із необструктивною формою азооспермії за різних видів секреторної неплідності

Групи	Аплазія гермінальних клітин, в поодиноких каналцях невелика кількість сперматогоній, кількість біоптатів	Аплазія гермінальних клітин із фокальним неповним сперматогенезом –зупинкою дозрівання на рівні сперматоцитів,кількість біоптатів	Аплазія гермінальних клітин із фокальним неповним сперматогенезом зупинкою дозрівання на рівні сперматидів, кількість біоптатів	Фокальний тубулярний склероз інтерстицію, кількість біоптатів	Набряк клітин Лейдіга, кількість біоптатів
Група 1 Секреторо-ендокринна неплідність. Гіпергонадотропний гіпогонадизм (підвищення ФСГ та ЛГ), n = 23	14	2	1	3	3
Група 2 Секреторо-ендокринна неплідність. Гіпергонадотропний гіпогонадизм (ізольоване підвищення ФСГ), n = 19	12	3	-	2	2
Група 3 Секреторо-ендокринна неплідність. Гіпергонадотропний гіпогонадизм (ізольоване підвищення ЛГ), n = 4	4	-	-	-	-
Група 4 Секреторна неплідність. Нормогонадотропний гіпогонадизм, n = 23	12	-	6	5	-

У трьох (13,0 %) пацієнтів групи 1 гістологічно не виявлено ураження інтерстицію. У 3 (13,0 %) пацієнтів визначався набряк клітин Лейдіга, які місцями формували невеликі кітинні острівці (ймовірно стан, що передував склерозу).

У групі 2 у трьох (15,8 %) пацієнтів гістологічний аналіз показав, що у каналцях наявна зменшена рядність герміногенних клітин, представлених здебільшого сперматогоніями і сперматоцитами. У частині каналців визначаються лише 1-2 клітинні ряди, в яких переважають клітини Сертолі і виявляється незначна кількість сперматогоній. Зрілих клітин кінцевих стадій сперматогенезу не виявлено. У інших 12 (63,2 %) пацієнтів гістологічна картина практично аналогічна. Майже в усіх каналцях наявний лише один клітинний ряд, побудований із витягнутах перпендикулярно до базальної мембрани клітин Сертолі, що розташовані паралельно одна одній.

Просвіт каналців порожній і лише в поодиноких каналцях зустрічається невелика кількість герміногенних клітин, представлених здебільшого сперматогоніями. У двох (10,5 %) із 19 пацієнтів в інтерстиції визначався набряк невеликих груп клітин Лейдіга, а у двох (10,5 %) – стінки деяких каналців були потовщеними та склерозованими, в стромі спостерігався фокальний фіброз.

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

Серед 23 пацієнтів (група 4) з нормогонадотропним гіпогонадизмом, у 12 пацієнтів (52,2 %) спостерігалась аплазія гермінальних клітин, в поодиноких каналцях невелика кількість сперматогоній. У 6 (26,0 %) аплазія гермінальних клітин із фокальним неповним сперматогенезом – зупинкою дозрівання на рівні сперматидів. І у 5 (21,7 %) хворих спостерігався фокальний тубулярний склероз інтерстицію.

4.2 Морфо-функціональна характеристика біопатів ячок при обструктивній формі азооспермії.

У 50 пацієнтів зі збереженим сперматогенезом встановлений діагноз «екскреторно-обтураційна неплідність» (обструктивна азооспермія). Серед обстежених у 27 (54,0 %) 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 19 (38,0 %) будь які, вражаючи фетильність фактори в анамнезі заперечували (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

Показники стану пацієнтів при екскреторно-обтураційній неплідності, n = 38.

Діагноз	Кількість/відсоток
Збережений сперматогенез	50 (100 %)
Орхоепідидиміт	27 (54,0 %)
Орхопексія з приводу крипторхізму	1 (2,0 %)
Травма калитки	3 (6,0 %)
Невідомий анамнез	19 (38,0 %)

Гіпоплазія яєчок (менше 4 см в найбільшому розмірі) спостерігалась у шести (12,0 %) хворих (табл. 4.3). Також, лише у п'яти (10,0 %) – пальпувались чоткопочібні ділянки ущільнення на рівні дистальних відділів сім'явивідних проток і вивідної протоки придатків яєчок. В двох (4,0 %) пацієнтів, за даними УЗД візуалізувалися сильно кальциновані сім'явивідні протоки.

У шести (8,0 %) пацієнтів не пальпувались дистальні відділи сім'явивідних протоків, у інших 33 (66,0 %) пацієнтів при пальпації органів калитки патології не виявлено, навіть після перенесеного в 16 із них орхоепідидиміту.

Таблиця 4.3

Стан яєчок за даними УЗ діагностики та пальпації, n = 38.

Стан	Кількість/відсотки
Гіпоплазія яєчок	6 (12,0 %)
Ущільнення сім'явивідних протоків	5 (10,0 %)
Кальциновані протоки	2 (4,0 %)
Не пальпуються дистальні відділи сім'явивідних протоків	4 (8,0 %)
При пальпації калитки патології не виявлено	33 (66,0 %)

У 49 (98,0 %) пацієнтів групи з ОА виявлена азооспермія, в одного (2,0 %) – стійка лейкоцитозооспермія.

За результатами гістологічного аналізу біоптатів яєчок, виявлено, що у 44 (88,0 %) пацієнтів групи із обструктивною формою азооспермії гістологічна картина збереженого сперматогенезу однотипна (табл. 4.4).

У більшості каналців кількість клітинних рядів збережена, в них визначаються клітини різних стадій сперматогенезу: сперматогонії, сперматоцити, зокрема з поодинокими фігурами поділу, помірна кількість сперматидів. У просвіті каналців виявляються злуцені клітини та помірна кількість сперматозоїдів. У деяких каналцях кількість клітинних рядів була

зменшена, хоча в них теж ідентифікувалися клітини різних стадій сперматогенезу, а в просвіті - сперматозоїди. Клітини Сертолі збережені. У стромі визначаються невеликі скупчення клітин Лейдіга. У трьох із 50 даних пацієнтів виявлено набряк інтерстицію.

Таблиця 4.4

Гістологічний аналіз біоптатів яєчок при екскреторно-обтураційній неплідності (обструктивна азооспермія), n = 36.

Гістологічний аналіз	Кількість/відсотки
Збережений сперматогенез (клітини різних стадій сперматогенезу: сперматогонії, сперматоцити, сперматиди, в просвіті каналців сперматозоїди). Клітини Сертолі збережені. В стромі невеликі скупчення клітин Лейдіга.	44 (88,0 %)
Збережений сперматогенез і склероз.	6 (12,0 %)

У шести (12,0 %) пацієнтів відзначали збережений сперматогенез і фокальний тубулярний склероз, зумовлений ймовірно обструкцією сім'явивідних протоків. Більш як в половині каналців кількість клітинних рядів збережена, в них визначаються клітини різних стадій сперматогенезу: сперматогонії, сперматоцити, помірна кількість сперматозоїдів. У просвіті деяких каналців визначаються злуцнені клітини. У деяких каналцях кількість клітинних рядів зменшена, а клітини Сертолі збережені, в деяких виявляється лише один клітинний ряд. Стінки таких каналців потовщені та склерозовані. Довкола багатьох каналців зберігається фіброз. У стромі визначається фокальна лімфо-макрофагальна запальна інфільтрація, фокальний склероз і поодинокі групи клітин Лейдіга.

Чоловікам з ОА запропоновано звернутись у клініку репродуктології для виконання екстракорпорального запліднення.

На основі отриманих результатів дослідження гістологічних препаратів біоптатів яєчок можна запропонувати наступну бальну систему оцінки для біоптатів (табл. 4.5).

Дана бальна оцінка погоджується з пропозиціями інших дослідників [31, 84].

Таблиця 4.5

Бальна оцінка гістологічних показників біоптатів яєчок чоловіків при азооспермії

Бал	Гістологічний критерій
10	Повноцінний сперматогенез
9	Помірно порушений сперматогенез, багато пізніх сперматид, дезорганізований епітелій
8	< 5 сперматозоїдів у каналці, кілька пізніх сперматид
7	Немає сперматозоїдів, немає пізніх сперматид, багато ранніх сперматид
6	Немає сперматозоїдів, немає пізніх сперматид, кілька ранніх сперматид
5	Немає сперматозоїдів, немає сперматид, багато сперматоцитів
4	Немає сперматозоїдів, немає сперматид, кілька сперматоцитів
3	Лише сперматогонії
2	Немає гермінальних клітин, лише клітини Сертолі
1	Немає сперматогенного епітелію

Пацієнтам із набутою обструкцією придатків яєчок можна пропонувати однобічне чи двобічне мікрохірургічне виконання вазоепідидимоаностомозу кінець в кінець чи кінець в бік. Перед мікрохірургічним втручанням необхідно кріоконсервувати сперматозоїди з придатка для подальших потреб ICSI у випадку невдалої операції.

Анатомічна реканалізація, зазвичай, відбувається на 3 – 18 місяць у 60 – 87 % чоловіків, а її успіх для подальшої вагітності коливається в межах 10 – 43 % [7, 45, 56, 182, 210].

При гістологічному дослідженні біоптатів яєчок пацієнтів із ОА виявлені різнокаліберні та деформовані звивисті каналці. Значна їх частина містила сперматогенні клітини, що знаходились на різних рівнях дозрівання, включаючи сперматогонії, сперматоцити і сперматозоїди. Дана гістологічна картина розглядається як послаблений сперматогенез.

В біоптатах яєчка пацієнтів з НОА виявлені групи звивистих каналців із тонкою базальною мембраною, одиничними клітинами Сертолі і сперматогоніями. У просвіті каналців визначалися сперматогенні клітини на різних стадіях розвитку, але не далше сперматид. Отже, ультраструктурні зміни паренхіми яєчка відіграють провідну роль в розумінні перспектив виконання екстракорпорального запліднення власними сперматозоїдами.

Зрозуміло, що отримати зразки тестикулярної тканини набагато складніше ніж отримати еякулят чи зразки крові для досліджень. Тому існує потреба в пошуках біомаркерів сперматогенезу в сім'яній плазмі та венозній крові. Раніше таким маркером вважали ФСГ, але він залежить від функціонування гіпоталамусу, тому потрібні додаткові маркери для визначення інфертильності чоловіків [25, 74, 79, 101].

Таким чином, у зв'язку з поліетіологічністю форм азооспермії є необхідність пошуку, як ми відмічали, універсальних маркерів – біохімічних, цитогенетичних, зміна рівня яких дозволяла б визначати тактику ведення пацієнтів із порушенням фертильності та перспективність їх лікування.

Матеріали до даного розділу представлені в публікаціях:

1. 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.
2. 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.
  3. Vorobets D, Pospishil Yu, **Vorobets M**. Testicle biopsy results of patients with the non-obstructive azoospermia. Здоровье мужчины. 2012;4/2:71-73.
  4. 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.
  5. **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.

## РОЗДІЛ 5

### ГОРМОНАЛЬНА, БІОХІМІЧНА ТА ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СІМ'ЯНОЇ ПЛАЗМИ, СИРОВАТКИ КРОВІ ТА ЛІМФОЦИТІВ ПРИ АЗООСПЕРМІЇ

Оскільки сперматогенез, який є гормонозалежним процесом, регулюється гіпоталамо-гіпофізарно-гонадною системою видається актуальним визначення концентрації статевих гормонів при азооспермії.

#### 5.1 Рівень статевих гормонів у пацієнтів із необструктивною формою азооспермії за різних видів секреторної неплідності

Етіологія НОА різноманітна і пов'язана із захворюваннями, що спричиняють пошкодження тканини яєчка (первинний чи вторинний гіпогонадизм, крипторхізм, варикоцеле, орхіт, епідидиміт, хромосомні аномалії, делеції Y-хромосоми, травми мошонки тощо [100, 141, 143]. Також до пошкодження сперматогенного епітелію призводять деякі лікарські препарати, гормональна та хіміотерапія, високі температури, іонізуюча радіація, інтоксикація тощо [48].

При цьому важливо встановити гормональний статус пацієнта, для чого визначають рівень ФСГ, лютеїнізуючого гормону, тестостерону тощо у венозній крові [30]. Так, при НОА, перспективним для терапії станом є гіпогонадотропний гіпогонадизм – ендокринне захворювання, що характеризується недостатністю сперматогенезу внаслідок відсутності його стимуляції гонадотропінами [5, 41, 44, 45].

Отримані нами дані свідчать, що у 23 пацієнтів (група 1) з тотальним гіпергонадотропним гіпогонадизмом рівень ФСГ у крові становить  $28,1 \pm 3,75$  МО/л (рис. 5.1).

У групі 2 (n = 19) із секреторно-ендокринною неплідністю (гіпергонадотропний гіпогонадизм, ізольоване підвищення ФСГ) рівень ФСГ у 2 рази нижчий, в порівнянні з групою 1, і становить  $13,85 \pm 0,62$  МО/л. У групі 3 (n = 4) у пацієнтів із секреторно-ендокринною неплідністю (гіпергонадотропний гіпогонадизм, ізольоване підвищення ЛГ) рівень ФСГ ще менший і становить  $8,75 \pm 0,75$  МО/мл. При секреторній неплідності з нормогонадотропним гіпогонадизмом (група 4, n=23) рівень ФСГ становить  $6,2 \pm 0,5$  МО/мл.

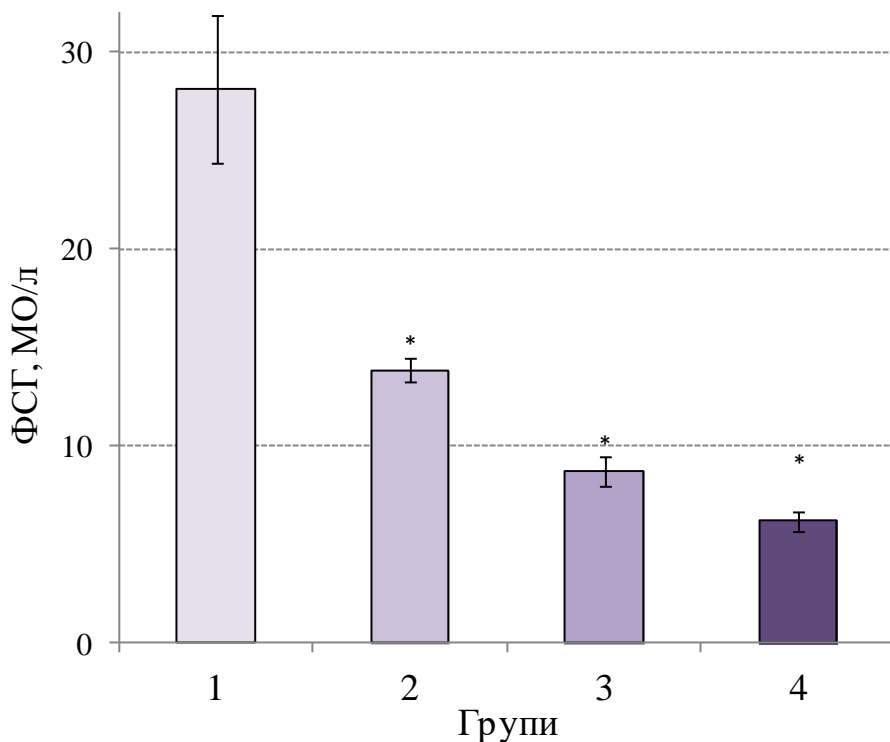


Рис. 5.1. Рівень фолікулостимулюючого гормону у сироватці крові у пацієнтів з необструктивною формою азооспермії.

Примітка: \*  $p < 0,05$  щодо показників пацієнтів з тотальним гіпергонадотропним гіпогонадизмом

Рівень ЛГ в групі 1 при секреторно-ендокринній неплідності (гіпергонадотропний гіпогонадизм, підвищений ФСГ і ЛГ) становить  $12,52 \pm 1,63$  МО/л (рис. 5.2).

В групі 2 при секреторно-ендокринній неплідності (гіпергонадотропний гіпогонадизм, ізольоване підвищення ФСГ) цей показник становить  $5,3 \pm 0,64$

МО/л. В групі 3 при секреторно-ендокринній неплідності (гіпергонадотропний гіпогонадізм, ізольоване підвищення ЛГ) рівень ЛГ дорівнює  $8,65 \pm 0,15$  МО/л. У групі 4, у пацієнтів із секреторною неплідністю при нормогонадотропному гіпогонадізмом рівень ЛГ склав  $4,8 \pm 0,5$  МО/мл.

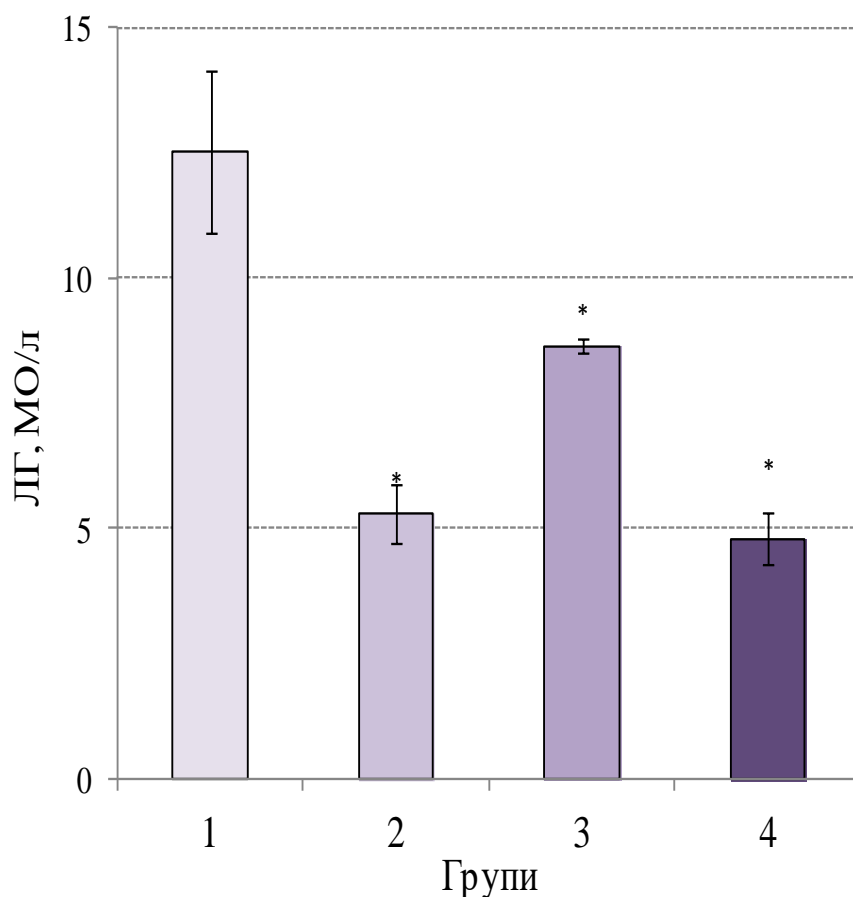


Рис. 5.2. Рівень лютеїнізуючого гормону у сироватці крові у пацієнтів з необструктивною формою азооспермії

Примітка: \* $p < 0,05$  щодо показників пацієнтів з тотальним гіпергонадотропним гіпогонадізмом

Щодо тестостерону, то в групі 1 його рівень склав  $16,13 \pm 3,51$ , в групі 2 –  $14,63 \pm 4,95$ , в групі 3 –  $11,6 \pm 0,4$  і в групі 4 –  $30,7 \pm 7,5$  нмоль/л (рис. 5.3). Лише у трьох (13,0 %) пацієнтів групи 1 спостерігався знижений рівень тестостерону. У п'яти (21,7 %) пацієнтів групи 2 теж спостерігався знижений рівень тестостерону.

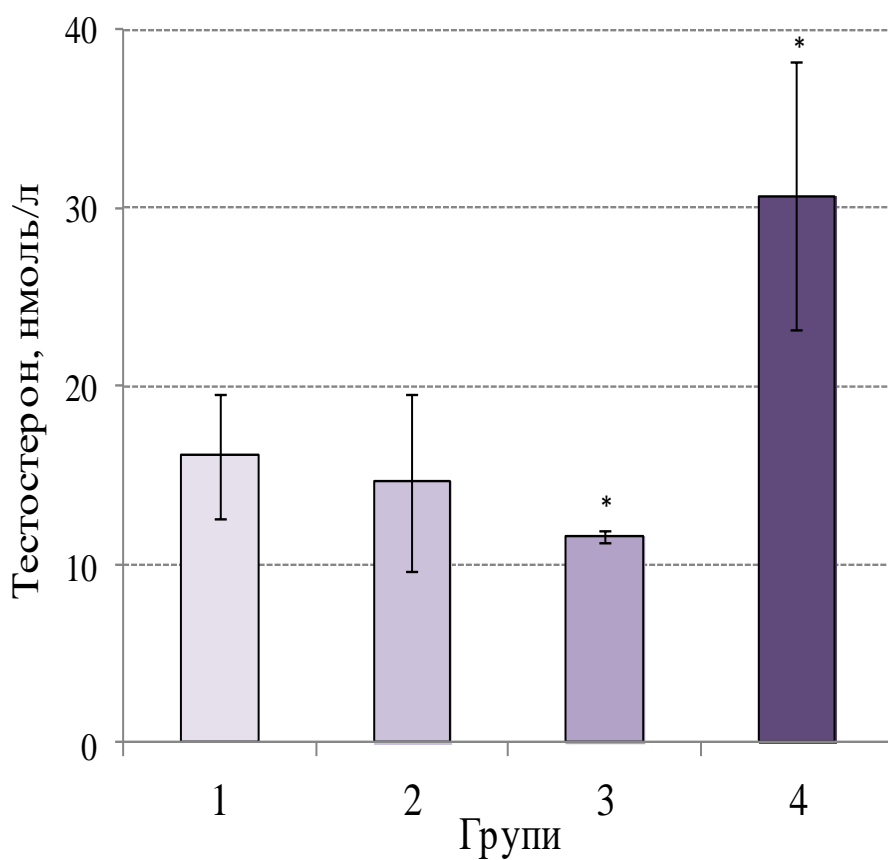


Рис. 5.3. Рівень тестостерону у сироватці крові у пацієнтів з необструктивною формою азооспермії

Примітка: \* $p < 0,05$  щодо показників пацієнтів з тотальним гіпергонадотропним гіпогонадізмом

У групі 1 концентрація естрадіолу складала  $23,74 \pm 6,89$ , в групі 2 –  $40,1 \pm 12,7$ , в групі 3 –  $34,0 \pm 1,1$ , і в групі 4 –  $36,8 \pm 8,1$  пг/мл (рис. 5.4).

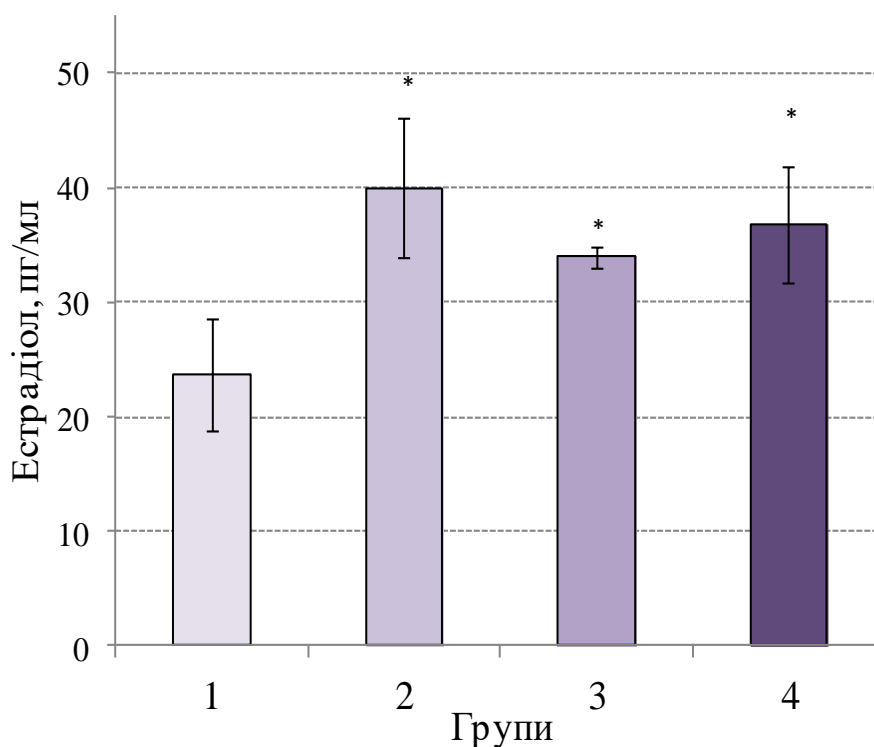


Рис. 5.4. Рівень естрадіолу у сироватці крові у пацієнтів з необструктивною формою азооспермії

Примітка: \* $p < 0,05$  щодо показників пацієнтів з тотальним гіпергонадотропним гіпогонадізмом

Концентрація пролактину в крові пацієнтів групи 1 складала  $12,42 \pm 2,24$ , групи 2 –  $8,6 \pm 0,4$ , групи 3 –  $3,1 \pm 1,3$ , а групи 4 –  $8,3 \pm 1,2$  нг/мл (рис. 5.5). 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 - зростає 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 – зростає інший.

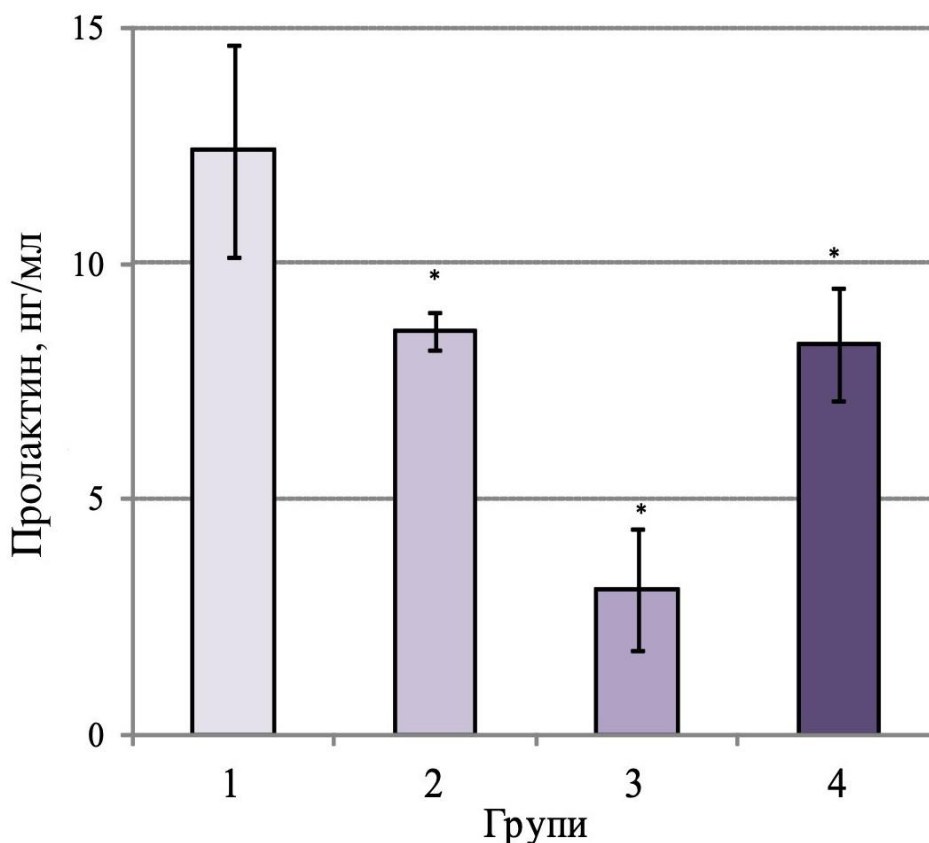


Рис. 5.5. Рівень пролактину у сироватці крові у пацієнтів з необструктивною формою азооспермії

Примітка: \* $p < 0,05$  щодо показників пацієнтів з тотальним гіпергонадотропним гіпогонадизмом

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 ( $r = -0,51$ ), що неможливо однозначно інтерпретувати, тестостерону та пролактину ( $r = -0,59$ ).

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 зниженою – 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 пролактинемії.

Слід відмітити, що оцінка гормонального статусу – необхідний компонент в обстеженні всіх чоловіків, у яких виявлені зміни в спермограмі чи порушення сексуальної функції. Зрілі, здатні до запліднення сперматозоїди це продукт складного процесу, що залежить від нормального гормонального профілю. Складність патогенезу чоловічого неплоддя полягає в тому, що в ньому задіяні не тільки ЦНС, гонади, органи-мішені, але й інші відділи нейроендокринної системи – наднирники, щитовидна залоза, симпато-адреналова система [47].

Таким чином, судячи з наших і літературних даних, можна зробити висновок, що важливим показником азооспермії є ФСГ в сироватці крові. В цілому концентрація ФСГ в сироватці крові зворотно пропорційно корелює з вираженістю порушення сперматогенезу. Недавні дослідження показали, що підвищення рівня ФСГ пов'язано з низькою ймовірністю виявлення сперматозоїдів в біоптаті яєчок [128].

Виходячи з цього, концентрація ФСГ може бути використана для прогнозування збереження сперматозоїдів в яєчках для виконання TESE [79, 128, 138, 152]. Хоча ФСГ відображає переважаючу картину сперматогенезу, він може не вказувати на ізольовані збережені ділянки сперматогенезу в середині яєчка.

Однак, вважають, що концентрація ФСГ в сироватці крові не пов'язана з пізніми стадіями сперматогенезу [5, 15, 31].

## 5.2 Рівень статевих гормонів у пацієнтів із обструктивною формою азооспермії

При екскреторно-обтураційній неплодності (обструктивна форма азооспермії) рівень ФСГ у крові пацієнтів ( $n = 50$ ) складав  $5,72 \pm 1,34$  МО/л, рівень ЛГ –  $5,29 \pm 0,53$  МО/л, рівень загального тестостерону –  $17,25 \pm 2,46$  нмоль/л, естрадіолу –  $42,42 \pm 7,76$  пг/мл, а пролактину –  $6,0 \pm 0,8$  нг/мл (табл. 5.1).



В одного із двох пацієнтів зі змішаною формою неплідності та збереженим сперматогенезом коли гіпергонадотропний гіпогонадизм (ізольоване підвищення ФСГ) поєднувався з обструкцією сім'явивідних протоків після перенесеного урогенітального запального процесу, ФСГ становила 23,1 МО/л.

Таблиця 5.1

Рівень статевих гормонів у пацієнтів із обструктивною формою азооспермії (M ± m, n = 50)

Групи	ФСГ (МО/л)	ЛГ (МО/л)	Тестостерон (нмоль/л)	Естрадіол (пг/мл)	Пролактин (нГ/мл)
Екскреторно- обтураційна неплідність	5,72 ± 1,34	5,29 ± 0,53	17,25 ± 2,46	42,42 ± 7,76	6,0 ± 0,8

### 5.3 Концентрація інгібіну В в сироватці крові при необструктивній формі азооспермії.

Одним із важливих маркерів, що дозволяє робити висновок про морфофункціональний стан паренхіми яєчка, може бути гормон інгібін В, який є універсальним ростовим фактором, що належить до сімейства трансформуючих факторів росту  $\beta$  [19, 25, 60, 70, 79, 100, 128, 131, 141, 143].

У проведених нами дослідженнях за нормозооспермії (n=46) рівень інгібіну В у сироватці крові складав 217,3±50,8 пг/мл. При НОА (n=69) рівень інгібіну В був нижчим за норму 2,7 раза і складав 59,8±19,6 пг/мл (рис. 5.5).

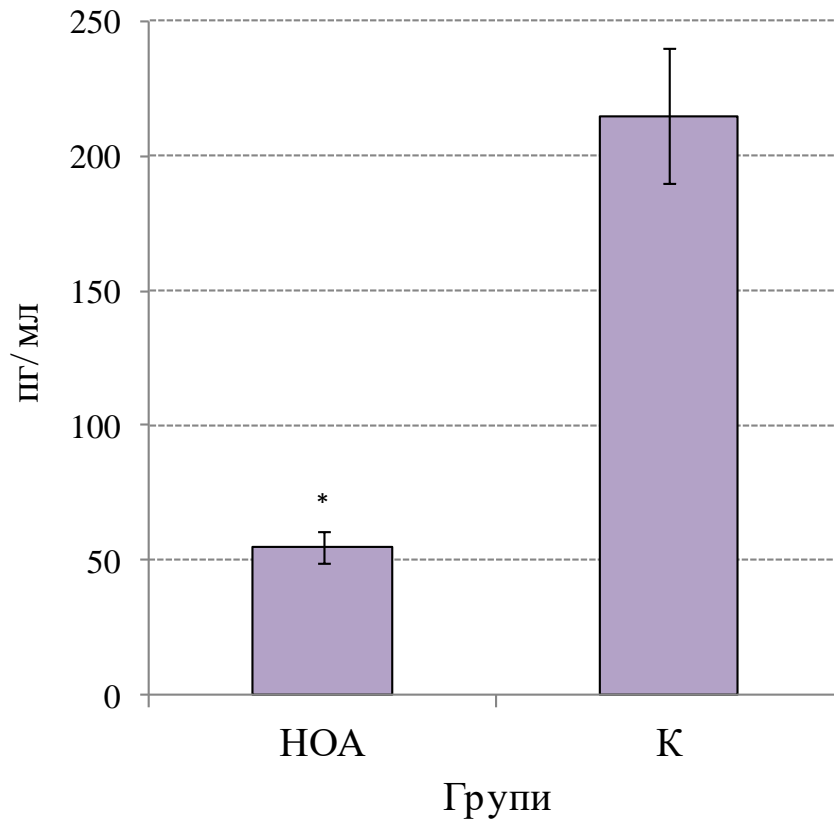


Рис. 5.5. Показники інгібіну В при необструктивній формі азооспермії

Примітка: \* $p < 0,001$  стосовно величин в осіб групи контролю (нормозооспермія).

Відомо, що секреція інгібіну В прямо залежить від рівня ФСГ та сперматогензу [100, 102, 103]. Рівень інгібіну В менше 80 пкг/мл свідчить про наявність репродуктивних проблем у чоловіка. Ці дані прямо корелюють із функцією яєчок. Концентрація інгібіну В вища у чоловіків, які не мають проблем із зачаттям [100]. У пацієнтів в яких проведена кастрація, інгібіну В не виявлявся. Це строго підтверджує те, що інгібіну В відображає функцію яєчок, зокрема клітин Сертолі. Існує взаємозв'язок між рівнем інгібіну В, рівнем ФСГ та функцією яєчок [17, 19, 106, 107, 128, 141]. Показано, що рівень інгібіну В в сироватці крові відображає функціональний стан сперматогенезу, оскільки приймає участь в зворотному зв'язку гіпоталамо-гіпофізарно-тестикулярної осі [25]. Припускається, що оцінка рівня інгібіну В в сироватці крові може стати альтернативою біопсії, а також використовуватись для диференційної

діагностики непліддя чоловіків [128, 74]. Дані літератури свідчать, що при нормозооспермії рівень інгібіну В в сироватці крові становить  $202,0 \pm 47,2$  пг/мл, а при азооспермії –  $61,0 \pm 78$  пг/мл [25].

Скринінг кореляційних зв'язків виявив, що з-поміж параметрів статевих гормонів найтісніше корелює концентрація тестостерону і вміст інгібіну В (табл. 5.2). Відзначається вірогідний негативний кореляційний зв'язок середньої сили.

Таблиця 5.2

Кореляційний зв'язок між концентрацією інгібіну В, статевих гормонів та інших показників у пацієнтів із азооспермією

Показники		Коефіцієнт кореляції
Інгібін В	ФСГ	0,21
	ЛГ	-0,16
	Пролактин	-0,52
	Тестостерон	-0,62
	Естрадіол	0,12
	Розмір яєчок	0,72
	Лінійна швидкість кровотоку	0,24

Разом з тим, значущі кореляційні зв'язки середньої сили виявлено між концентрацією пролактину і вміст інгібіну В. З-поміж інструментальних параметрів виявлено достовірний позитивний кореляційний зв'язок між розмірами яєчок азооспермічних чоловіків і вмістом інгібіну В.

#### 5.4 Про-/антиоксидантна система при азооспермії

Згідно сучасних уявлень розвиток патологічних процесів в організмі супроводжуються порушенням механізмів антиоксидантного захисту клітин [1, 4, 64, 73, 80, 110, 125, 149, 150, 165, 215, 216].

Нами проведено дослідження процесів ПОЛ і системи глутатіону в сім'яній плазмі чоловіків із встановленим діагнозом необструктивна азооспермія. (табл. 5.3). Показано активацію процесів ПОЛ, за визначенням концентрації малонового діальдегіду. Так, у сім'яній плазмі практично здорових чоловіків вона складає  $2,3 \pm 0,3$  мкмоль/л. При необструктивній формі азооспермії процеси ПОЛ інтенсифікуються і зростають 1,3 раза ( $p < 0,05$ ). Ці дані певною мірою погоджуються з іншими де показано зростання рівня МДА та зниження концентрації відновленого глутатіону в сім'яній плазмі при азооспермії [28, 29, 53, 169].

Одночасно з активацією пероксидації ліпідів виявлено достовірне зниження активності глутатіонпероксидази щодо контрольних значень, з  $18,3 \pm 2,1$  нмоль GSH/хв·мг протеїну (нормозооспермія) до  $14,1 \pm 1,6$  нмоль GSH/хв·мг протеїну (НОА) ( $p < 0,05$ ), тобто в 1,3 раза. Щодо активності глутатіонредуктази, то при НОА вона в 1,3 нижча ( $p < 0,05$ ).

Таблиця 5.3

Стан глутатіонової антиоксидантої системи та пероксидації ліпідів у сім'яній плазмі чоловіків з азооспермією ( $M \pm m$ ,  $n=18-22$ ).

Показники	Необструктивна форма азооспермії	Практично здорові чоловіки (нормозооспермія)
МДА, мкмоль/мг протеїну	$3,7 \pm 0,3^*$	$2,3 \pm 0,3$
ГП, нмоль GSH/хв·мг протеїну	$14,1 \pm 1,4^*$	$18,3 \pm 1,5$
ГР, нмоль NADPH/хв·мг протеїну	$0,24 \pm 0,04$	$0,32 \pm 0,05$
ГТ, нмоль GSH/хв·мг протеїну	$2,81 \pm 0,18^*$	$3,41 \pm 0,23$

Примітка. Зміни вірогідні щодо величин в осіб контрольної групи,  $* p < 0,05$ .

При дослідженні активності глутатіонтрансферази виявлено, що в нормі вона складає  $3,41 \pm 0,38$  нмоль GSH/хв·мг протеїну. При необструктивній формі азооспермії активність глутатіонтрансферази достовірно знижується, в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ). Порушення експресії сімейства генів глутатіонтрансферази пов'язують із розвитком інфертильності чоловіків [111].

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 в контролі була  $2,3 \pm 0,3$  мкМ, а при необструктивній азооспермії -  $3,7 \pm 0,3$  мкМ, тобто зростала в 1,5 раза (табл. 5.4). Підвищення концентрації МДА в сім'яній плазмі азооспермічних чоловіків відмічено і іншими авторами [169, 186].

Таблиця 5.4

Показники про- та антиоксидантної системи в сім'яній плазмі ( $M \pm m$ ,  $n=18-22$ ).

Групи Показники	Необструктивна форма азооспермії	Контроль
МДА, мкмоль/л	$3,7 \pm 0,3^*$	$2,3 \pm 0,3$
Загальна антиоксидантна активність, мкмоль/л	$1,41 \pm 0,12^*$	$2,11 \pm 0,16$
GSH, мкмоль/л	$19,3 \pm 1,5^{**}$	$34,3 \pm 2,8$
GSHt, мкмоль/л	$38,4 \pm 3,4^{**}$	$57,3 \pm 4,9$
GSSG, мкмоль/л	$21,2 \pm 2,0$	$22,8 \pm 2,2$
GSH/GSSG	0,9	1,5
RI GSH	0,4	0,6

Примітка. Зміни вірогідні щодо величин в осіб контрольної групи, \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$

Більше того, пероксидація ліпідів спричиняє оксидативний стрес, що є однією з причин розвитку неплідності [186].

Загальна антиоксидантна активність при НОА знижувалась 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 на НОА є співвідношення відновленого глутатіону до окисненого в спермальній плазмі: при нормозоосперимії – 1,5, а при НОА – 0,9.

При вивченні окремих неезиматтичних компонентів глутатіонової антиоксидантної системи в сироватці крові було з'ясовано, що загальна антиоксидантна активність при НОА знижувалась в 1,2 раза (табл. 5.5).

Концентрація відновленого глутатіону знижувалась в 1,8 раза, а концентрація загального глутатіону знижувалась в 1,2 раза. При цьому достовірних змін в концентрації окисненого глутатіону як і у випадку сім'яної плазми не виявлено.

Обчислення редокс-індексу (RI GSH) продемонструвало зниження сумарної потужності даної системи в сім'яній плазмі чоловіків із необструктивною формою азооспермії в 1,5 раза. В сироватці крові такого зниження не спостерігається. Однак різке зниження концентрації відновленого глутатіону і його співвідношення до окисненого глутатіону в сироватці крові свідчить про посилене його використання як у сім'яній плазмі, так і в крові.

Таблиця 5.5

Показники про- та антиоксидантної неензиматичної системи в сироватці крові (M±m, n=18-22).

Показники \ Групи	Необструктивна форма азооспермії	Контроль
МДА, мкмоль/мг протеїну	42,4±4,3*	31,1±3,3
Загальна антиоксидантна активність, мкмоль/мг протеїна	0,98±0,12	1,2±0,14
GSH, нмоль/мг протеїна	11,2±1,15**	17,8±1,18
GSHt, нмоль/мг протеїна	16,1±1,52	19,6±1,84
GSSG, нмоль/мг протеїна	1,4±0,2	1,3±0,18
GSH/GSSG	8,0	13,7
RI GSH	0,9	0,9

Примітка. Зміни вірогідні щодо величин в осіб контрольної групи, \*p<0,05, \*\* p<0,01

Слід відмітити, що важливими показниками якості сперми є наявність в ній відповідних концентрацій фруктози, лимонної кислоти, цинку. Так, фруктоза є основним вуглеводом, що міститься в сім'яній плазмі, функція якого першочергово полягає в забезпеченні енергією руху сперматозоїдів [10, 225]. Існує прямий кореляційний зв'язок між концентрацією фруктози в сім'яній плазмі та рівнем тестостерону в сироватці крові. Лимонна кислота теж відіграє важливу роль в рухливості сперматозоїдів та їх концентрації в спермі. Нами виявлено, що при нормозооспермії концентрація фруктози в сім'яній плазмі становить 17,7±2,1 мкмоль/мл, в той час як при НОА вона дорівнює 23,8±1,7 мкмоль/мл, тобто в 1,3 раза вища (p<0,05) (табл. 5.6).

Біохімічні показники якості сім'яної плазми ( $M \pm m$ ).

Параметри	ОА (n=9)	НОА (n=16)	Контроль (нормозооспермія) (n=12)
Фруктоза, мкмоль/мл	18,1±2,5	23,8±1,7*	17,7±2,1
Лимонна кислота, мкмоль/мл	40,2±3,5	42,8±4,6	39,1±4,3
Цинк, ммоль/л	1,45±0,27	1,23±0,20	1,42±0,21

Примітка. Зміни вірогідні щодо величин в осіб контрольної групи, \* $p < 0,05$ .

При ОА змін в концентрації вказаних речовин не виявлено.

Підвищення концентрації фруктози при НОА спостерігають і інші дослідники [10].

Концентрація лимонної кислоти при ОА та НОА достовірно не змінюються. Літературні дані свідчать, що зменшення концентрації лимонної кислоти в еякуляті – ознака гіпоандрогенії [10]. Також достовірно не знижується концентрація цинку при НОА.

Таким чином, при необструктивній формі азооспермії в сім'яній плазмі і в сироватці крові інтенсифікуються процеси пероксидації ліпідів, знижуються концентрація відновленого глутатіону та знижуються активності ензимів глутатіонової антиоксидантної системи - глутатіонпероксидази та глутатіонтрансферази. Достовірно знижується концентрація фруктози.

### 5.5 Характеристика аргіназо-NO-синтазної системи при азооспермії

Оксид азоту, що продукується в NO-синтазній реакції регулює процес сперматогенезу, впливає на проліферацію та диференціацію клітин, життєздатність та рухливість сперматозоїдів [91, 118, 196, 216, 219].



В результаті проведених нами експериментів з'ясовано, що при НОА в сім'яній плазмі аргіназна активність складає  $7,6 \pm 0,8$  нмоль сечовини/хв на 1 мг протеїну (рис. 5.6).

При нормозооспермії ця активність була значно вищою і дорівнювала  $11,5 \pm 1,8$  нмоль сечовини/хв на 1 мг протеїну ( $p < 0,05$ ).

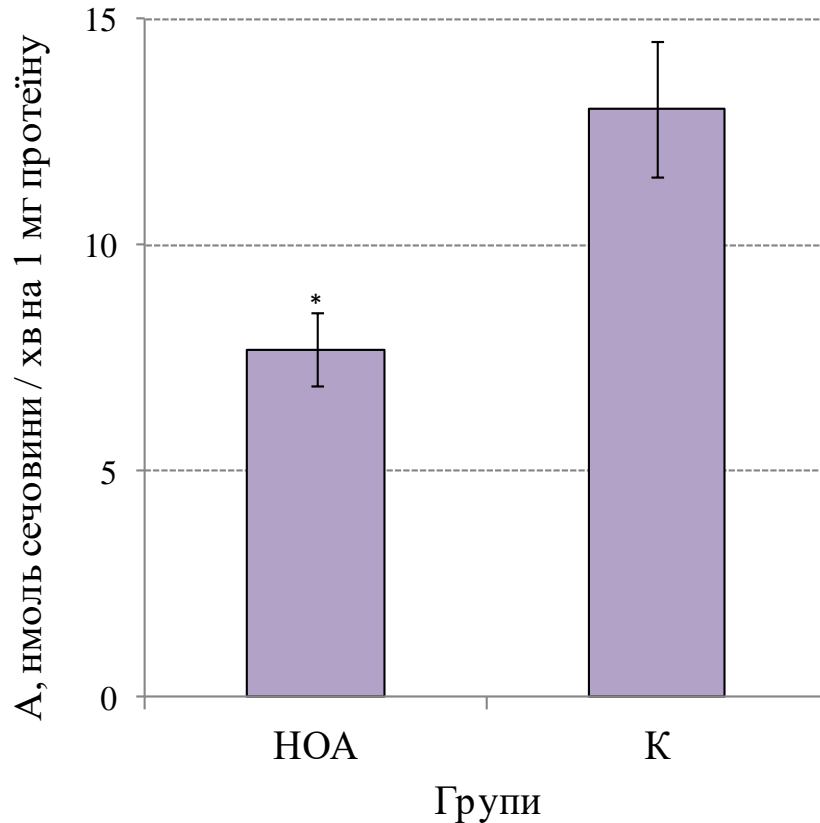


Рис. 5.6. Аргіназна активність сім'яної плазми чоловіків з азооспермією.

Примітка: \* $p < 0,001$  стосовно величин в осіб групи контролю.

Паралельно, у дослідженнях на сироватці крові показано, що аргіназна активність здорових осіб із нормозооспермією становить  $13,3 \pm 1,7$  нмоль сечовини/хв на 1 мг протеїну (рис. 5.7).

У пацієнтів з необструктивною формою азооспермії, які ймовірно перенесли інфекційні захворювання, аргіназна активність знижується до  $10,3 \pm 1,5$  нмоль сечовини/хв на 1 мг протеїну, тобто в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ).

Деякими авторами продемонстрована позитивна кореляція між активністю аргінази в сім'яній плазмі та об'ємом сперми, концентрацією сперматозоїдів, їх рухливістю [126].

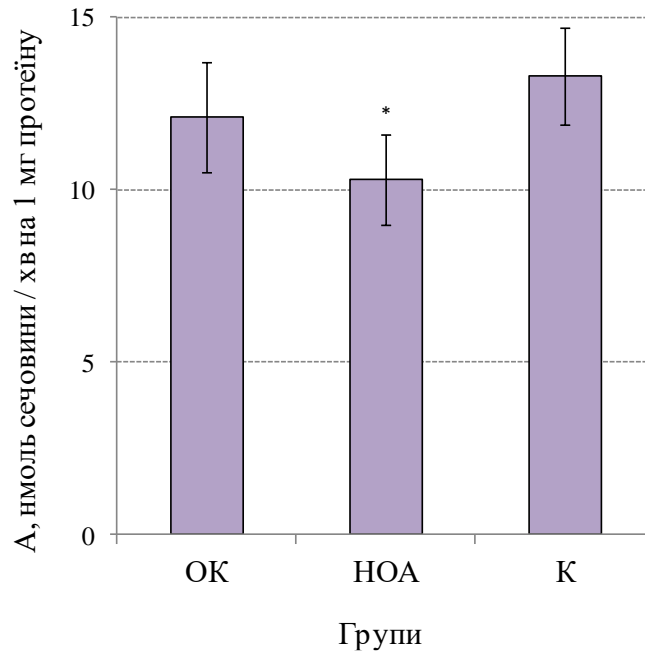


Рис. 5.7. Аргіназна активність сироватки крові чоловіків з азооспермією ( $M \pm m$ ,  $n = 9$ ).

Примітка: \* $p < 0,001$  стосовно величин в осіб групи контролю (нормозооспермія).

В результаті проведених досліджень встановлено, що активність cNOS в сім'яній плазмі практично здорових чоловіків (нормозооспермія) становить  $(21,4 \pm 2,9)$  нмоль  $\text{NADPH}(\text{H}^+)/\text{хв}$  на 1 мг протеїну (рис. 5.8).

При НОА активність cNOS достовірно не змінюється щодо контролю, становить  $18,2 \pm 2,3$  нмоль  $\text{NADPH}(\text{H}^+)/\text{хв}$  на 1 мг протеїну ( $p > 0,05$ ). Встановлено, що активність iNOS в сім'яній плазмі практично здорових чоловіків ідентифікується в незначній мірі, практично на межі похибки, та становить  $1,12 \pm 0,02$  нмоль  $\text{NADPH}(\text{H}^+)/\text{хв}$  на 1 мг протеїну. При НОА активність iNOS, яка є  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежною, зростає щодо контролю в 17,7 раза і становить  $19,8 \pm 2,2$  нмоль  $\text{NADPH}(\text{H}^+)/\text{хв}$  на 1 мг протеїну.

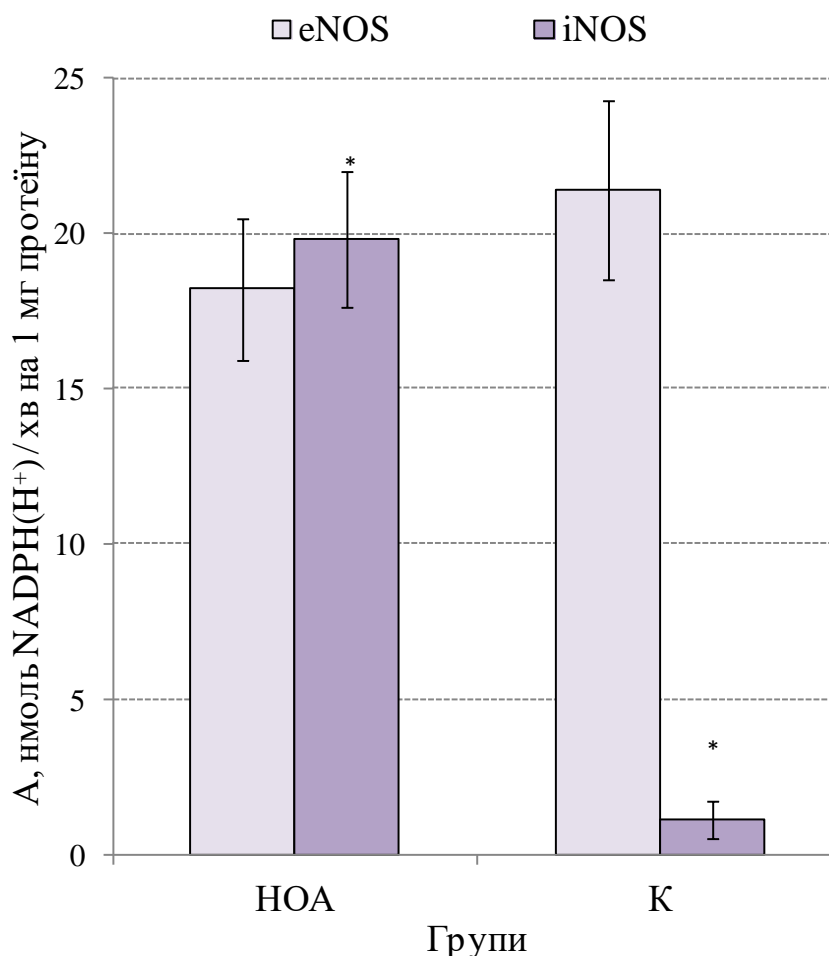


Рис. 5.8. Активність конститутивної та індукбельної ізоформ NO-синтази в спермальній плазмі чоловіків з азооспермією ( $M \pm m$ ,  $n = 9$ ).

Примітка: \* $p < 0,001$  стосовно величин в осіб групи контролю (нормозооспермія).

Наведений кореляційний зв'язок між активністю iNOS та концентрацією МДА в сім'яній плазмі свідчить, що при необструктивній формі азооспермії iNOS може активувати процеси пероксидації ліпідів (рис. 5.9).

Це підтверджується визначеною кореляційною залежністю між концентрацією МДА, як біомаркера пероксидації ліпідів та активністю iNOS в сім'яній плазмі (коефіцієнт кореляції становить  $r = 0,87$ ).

Результати щодо зростання активності iNOS узгоджуються з даними отриманими раніше, де також встановлено зростання активності та експресії iNOS у пацієнтів з азооспермією [98]. Показано, що iNOS яка розташована в

сім'яниках приймає участь в сперматогенезі та апоптозі клітин Сертолі та Лейдіга. Показано що, експресія cNOS в клітинах Сертолі в контролі значно вища ніж при НОА [117]. Вважають, що експресія cNOS в клітинах Сертолі асоційована з розвитком герміногенних клітин [120].

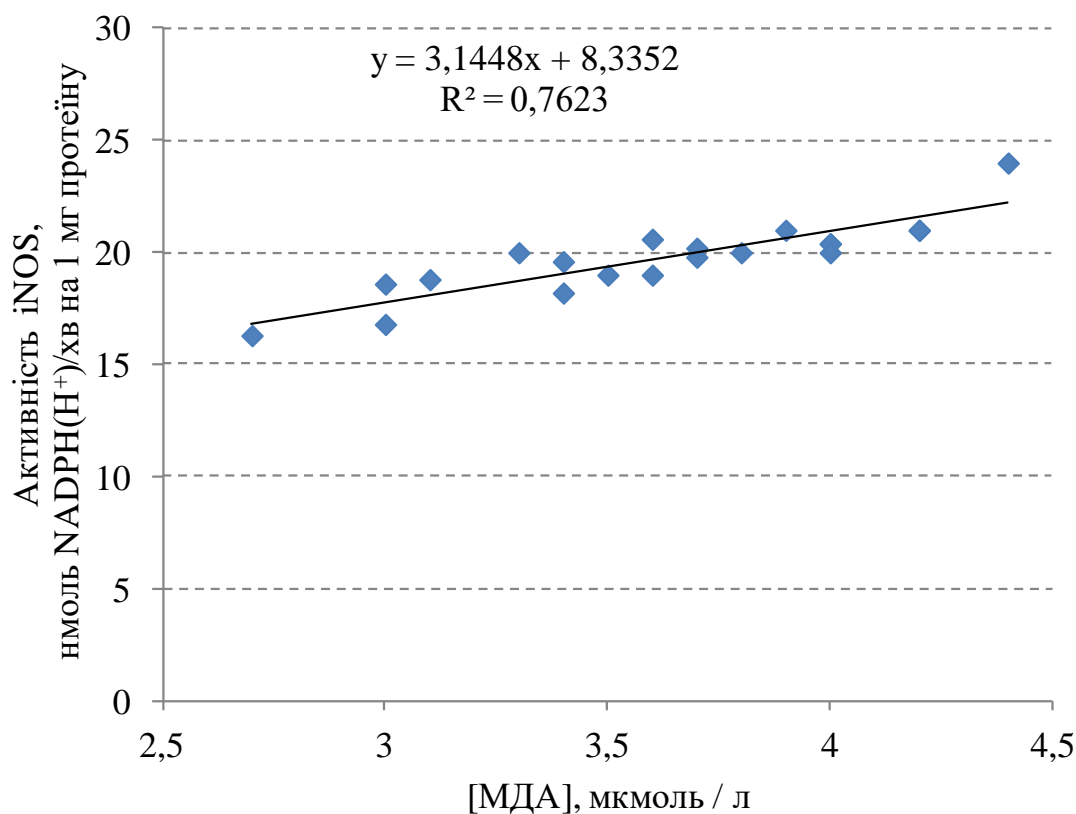


Рис. 5.9. Кореляційний зв'язок між концентрація малонового діальдегіду та активністю iNOS у сім'яній плазмі

Із отриманих даних можна зробити висновок про порушення при азооспермії співвідношення неокисного та окисного метаболізму L-аргініну в сім'яній плазмі (табл. 5.7).

Слід підкреслити, що cNOS, яка є  $\text{Ca}^{2+}$ -залежною, експресується постійно і достовірних змін в її активності, як і в активності аргінази при НОА не виявлено. Натомість iNOS в нормі не експресується, експресується тільки при запальних процесах, патологічних станах. Виходячи з цього ми вивчали співвідношення 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 показником розвитку необструктивної азооспермії.

Із цього також випливає, що інгібування iNOS може бути потенційною терапевтичною мішенню при лікуванні азооспермії.

Таблиця 5.7.

Співвідношення неокисного та окисного метаболізму L-аргініну в сім'яній плазмі чоловіків з азооспермією (M±m, n=8)

Пацієнти	Активність аргінази, нмоль сечовини/хв·мг протеїну	Активність iNOS, нмоль NADPH/хв·мг протеїну	Співвідношення аргіназа/iNOS
Нормозооспермія	13,3±1,7	1,12±0,02	11,9
НОА	10,3±1,5	19,8±2,2***	0,5

Примітка: \*\*\*p<0,001 стосовно величин в осіб групи контролю (нормозооспермія).

Це припущення підтверджується і іншими даними [171]. Гіперекспресія iNOS виявлена в різних клітинах сім'яників. Припускається, що NOS-залежний синтез фізіологічно необхідного NO (“базальний NO”) здійснюється за участю eNOS і nNOS, а NOS-залежний синтез додаткових кількостей NO в клітині за розвитку різних патологічних станів реалізується за участю iNOS.

Для оцінки інтенсивності функціонування NO-синтазного шляху метаболізму L-аргініну при азооспермії визначали вміст стабільних метаболітів NO: нітрит- ( $\text{NO}_2^-$ ) і нітрат- ( $\text{NO}_3^-$ ) аніонів у сім'яній плазмі. Виявлено, що за нормозооспермії концентрація нітрит-аніонів складає (2,32±0,33) мкмоль/л. Щодо концентрації нітрат-аніонів, то їх концентрація складала (4,71±0,56) мкмоль/л.

У пацієнтів з азооспермією спостерігалось достовірне зниження

концентрації  $\text{NO}_2^-$  до  $(1,43 \pm 0,24)$  мкмоль/л, тобто у 1,6 раза ( $p < 0,01$ ) (табл. 5.8).

Щодо  $\text{NO}_3^-$ , то його концентрація достовірно зростала, з  $4,11 \pm 0,56$  (контроль) до  $6,97 \pm 0,83$  мкмоль/л, тобто в 1,5 раза ( $p < 0,01$ ). Важливо відмітити, що при азооспермії суттєво зростає співвідношення  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ , у 4,9 раза. В той час як у нормі це співвідношення дорівнює 2,0 раза.

Таблиця 5.8.

Вміст стабільних метаболітів  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  у сім'яній плазмі чоловіків з необструктивною формою азооспермії

Пацієнти	Вміст $\text{NO}_2^-$ , пмоль/мл	Вміст $\text{NO}_3^-$ , нмоль/мл	$\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$
нормозооспермія	$2,32 \pm 0,33$	$4,71 \pm 0,56$	2,0
НОА	$1,43 \pm 0,24^*$	$6,97 \pm 0,83^*$	4,9

Примітка: зміни вірогідні щодо величин у практично здорових осіб,  
\* $p < 0,05$

Відомо, що не тільки сам оксид азоту, але й його похідні здійснюють важливі фізіологічні функції, беруть участь в регуляції апоптозу, ангіогенезу, вільнорадикальних процесів [91, 118].

Нами виявлено пряму кореляційну залежність між концентраціями МДА та стабільними метаболітами NO – нітрат- ( $\text{NO}_3^-$ ) аніонами (рис. 5.10). Зростання активності iNOS та розвиток оксидативного та нітразивного стресу є наслідком генерації активних форм Оксигену та Нітрогену, які є високореакційними.

Так, NO з високою спорідненістю взаємодіє з супероксид-аніоном, в результаті чого утворюється пероксинітрит ( $\text{ONOO}^-$ ), який має виражені цитотоксичні та мутагенні властивості [91, 118]. Зазвичай утворення  $\text{ONOO}^-$  незначне, оскільки надлишок супероксиду видаляється супероксиддисмутазою, але за наявності оксидативного стресу в організмі складаються всі передумови

для продукції  $\text{ONOO}^-$  у кількості достатній для виникнення та розвитку патологічних процесів [91, 118].

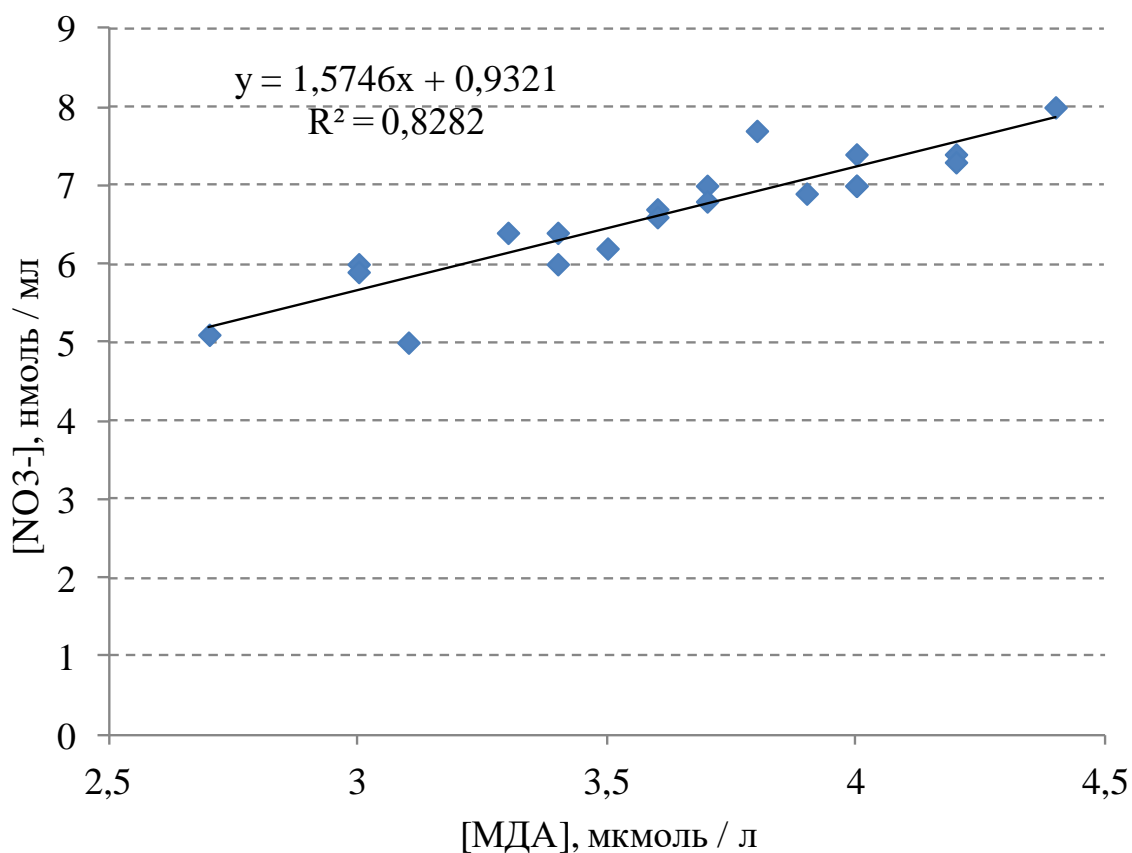


Рис. 5.10. Кореляційний зв'язок між концентраціями малонового діальдегіду та нітрат-аніонами.

Пероксинітрит має набагато більшу реакційну здатність в порівнянні з супероксидним радикалом та  $\text{NO}$ . Він бере участь в багатьох хімічних реакціях, зокрема у нітруванні залишків тирозину у протеїнах, ініціації пероксидного окиснення ліпідів, порушенні структури ДНК, що спричиняє виникнення мутацій, пригніченні транспорту електронів в мітохондріях тощо. Окрім того, він активує циклооксигеназу, яка є ключовим ферментом синтезу простагландинів, які є потужними медіаторами запалення [118].

Особливу цікавість до механізмів регуляції кожної з ізоформ ферменту зумовлена тим, що  $\text{NO}$  зумовлює плейотропні фізіологічні ефекти.

NO також легко вступає в реакцію з супероксидним аніон-радикалом. Реакція NO з супероксид-аніоном ( $O_2^-$ ) з наступним утворенням пероксинітриту ( $OONO^-$ ) і гідроксил-радикала ( $OH^-$ ) — це другий шлях метаболізму NO. Дані сполуки є високо реакційними вільними радикалами, володіють прооксидантними властивостями та спричиняють деструктивні ефекти щодо протеїнів і ліпідів [91, 118]. Пероксинітрит опосередковує цитотоксичні ефекти NO, такі як пошкодження ДНК, окиснення ліпопротеїдів низької щільності, нітрування тирозину, інгібування мітохондріального дихання [91, 118]. Третій шлях — утворення нітрозотіолів і динітрозольних комплексів негемового заліза, які є депо-формою NO.

Рівень активності NOS, аргінази та концентрація NO, поряд з іншими параметрами, може свідчити про функціональний стан клітини та бути прогностичними показниками для діагностування та оцінки ефективності фармакотерапії.

В цілому, отримані нами результати вказують на порушення аргіназо-NO-синтазної системи в сім'яній плазмі, що призводить до дисбалансу регуляторних систем, зокрема регуляторної функції NO. Зростання активності iNOS свідчить про гіперпродукцію NO. NO, що утворюється у надмірній кількості, при патологічних станах організму, має, як уже відмічалось, виражену цитотоксичну дію внаслідок утворення пероксинітриту – продукту взаємодії NO та супероксиданіон-радикала, здатного до деструкції практично всіх компонентів клітини [91, 118, 219].

## 5.6 Характеристика $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ -АТФаз при азооспермії

У всіх клітинах існує досконала система регуляції клітинного гомеостазу, а також внутрішньоклітинної  $Ca^{2+}$ -сигналізації для виконання ними своїх функцій [4, 99, 114, ]. Іонізований  $Ca^{2+}$  відіграє ключову роль в регуляції практично всіх внутрішньоклітинних процесів, включаючи проліферацію та диференціацію клітин, апоптоз тощо [35, 36, 99, 114]. Важлива роль у



підтриманні внутрішньоклітинного гомеостазу  $\text{Ca}^{2+}$  відводиться  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазі плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму. Слід ще раз підкреслити, що лімфоцити є «метаболічним дзеркалом» організму і, як і нервова система, швидко реагують на зовнішні впливи.

У результаті проведених досліджень встановлено, що  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазна активність плазматичної мембрани лімфоцитів крові чоловіків із нормозооспермією становила  $(2,79 \pm 0,27)$  мкмоль  $P_i/\text{хв} \cdot \text{мг}$  протеїну (рис. 5.11).

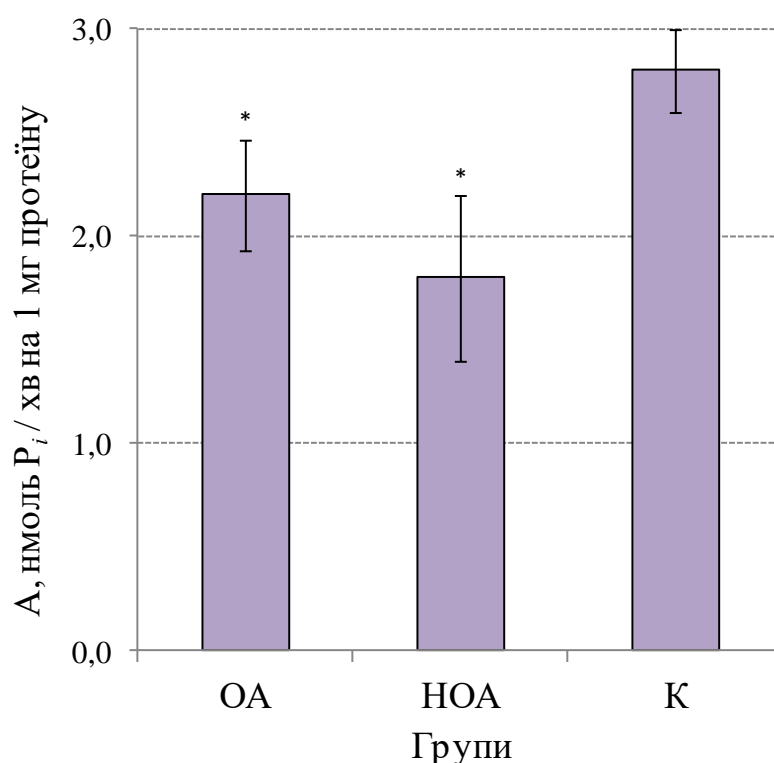


Рис. 5.11.  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазна активність плазматичної мембрани лімфоцитів крові чоловіків з обструктивною та необструктивною формами азооспермії ( $M \pm m$ ,  $n = 6-9$ )

Примітка: \* $p < 0,05$  стосовно величин в осіб групи контролю (нормозооспермія).

У пацієнтів з ОА  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазна активність плазматичної мембрани лімфоцитів крові достовірно не відрізнялась від фізіологічної норми та становила  $(2,73 \pm 0,31)$  мкмоль  $P_i/\text{хв}$  на 1 мг протеїну ( $p > 0,05$ ). При НОА активність цього

ензиму знижувалась до  $1,25 \pm 0,24$  мкмоль  $P_i$ /хв на 1 мг протеїну ( $p < 0,05$ ), тобто знижувалась в 1,5 рза. Зниження  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТФазної активності плазматичної мембрани лімфоцитів крові пацієнтів з НОА свідчить про зростання  $[Ca^{2+}]_i$  у цитозолі лімфоцитів.

При дослідженні  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТФазної активності мембран ЕПР лімфоцитів крові осіб із ОА та НОА виявлено, що вона становить  $1,91 \pm 0,27$ , та  $1,76 \pm 0,22$  мкмоль  $P_i$ /хв на 1 мг протеїну, відповідно. При нормозооспермії ця активність складає  $2,31 \pm 0,28$  мкмоль  $P_i$ /хв на 1 мг протеїну (рис. 5.12). Достовірне зниження  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТФазної активності спостерігається тільки при НОА ( $p < 0,05$ ).

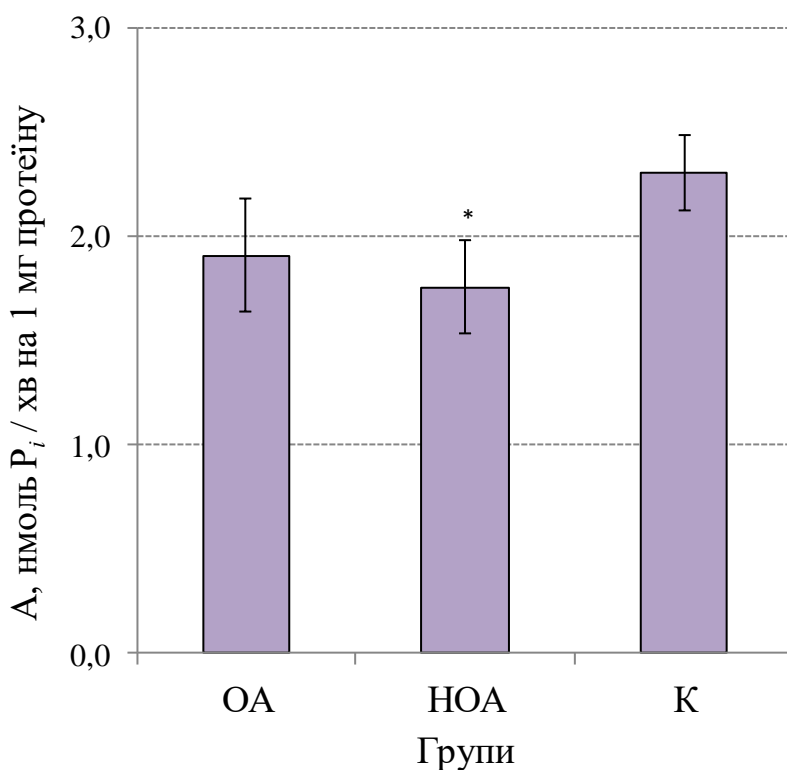


Рис. 5.12.  $Ca^{2+}, Mg^{2+}$ -АТФазна активність мембран ЕПР лімфоцитів крові пацієнтів з обструктивною та необструктивною формами азооспермії ( $M \pm m$ ,  $n = 6-9$ )

Примітка: \* $p < 0,05$  стосовно величин в осіб групи контролю (нормозооспермія).

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

### 5.7 Цитогенетична характеристика лімфоцитів крові чоловіків з азооспермією

Відомо, що в багатьох випадках непліддя чоловіків етіологічним чинником є генетичні порушення [69, 77, 88,92, 94, 101, 105, 121]. Хромосомні аномалії можуть бути однією з причин порушення сперматогенезу. Серед хромосомних аномалій виявляють зміни кількості статевих хромосом, і структурні перебудови аутосом чи Y-статевої хромосоми.

У наших дослідженнях у перших трьох рупах 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 48 (96,0 %) пацієнтів групи зі збереженим сперматогенезом (екскреторно-обтураційна неплідність) тільки в одного (4,3 %) спостерігався каріотип 46 XY (4) (p152q12). Ще у чотирьох (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 мікрodelецій не виявлено та аналізованих мутацій гена ТРБМ не виявлено.

Таким чином, найбільш важкою формою непліддя чоловіків є азооспермія, її обструктивна та необструктивна форми. Отримані власні дані свідчать, що окрім гістологічного аналізу біоптатів яєчок, інгібін В є найбільш важливим біохімічним маркером оцінки сперматогенезу при необструктивній формі азооспермії. Рівень ФСГ має суттєве прогностичне значення здебільшого при

гіпергонадотропному гіпогонадізмі. Оцінка рівня інгібіну В в багатьох випадках є альтернативною біопсією для диференційної діагностики непліддя чоловіків. При статистичному аналізі отриманих результатів виявлений прямий кореляційний зв'язок між об'ємом яєчок та рівнем інгібіну В. Між концентраціями в сироватці крові інгібіна В, з одного боку, і рівнем ФСГ, розмірами яєчок виявлена висока зворотня кореляція. Вважається, що концентрація інгібіну В сироватці крові відображає цілісність зародкового епітелію і клітин Сертолі.

Матеріали до даного розділу представлені в публікаціях:

1. 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.
2. Воробець ДЗ, Поспішіль ЮО, Марухняк РВ, **Воробець МЗ**. Гістологічна картина біоптату яєчок і рівень статевих гормонів у хворих з аспермією/азооспермією. Здоров'є людини. 2012;3:177-181.
3. **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.
4. 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.
5. Воробець ЗД, Фафула РВ, **Воробець МЗ**, Мельник ОВ. Аргиназний и NO-синтазний 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.

6. 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.
7. **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.
8. **Vorobets M**, Onufrovych O, Fafula R, Borzhievsky A, Vorobets Z. Pro-/antioxidant system in the development of non-obstructive form of azoospermia. Polish Journal of Science. 2020;30(1):15-18.
9. **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.

## РОЗДІЛ 6

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Проведені дослідження дозволили оцінити роль гормональних, гістологічних, біохімічних і цитогенетичних показників, що характеризують розвиток різних форм азооспермії. Азооспермію визначають як повну відсутність сперматозоїдів в еякуляті. Залежно від характеру та причин порушення сперматогенезу азооспермію диференціюють на обструктивну (екскреторну, ОА) та необструктивну (секреторну, НОА).

Основними причинами азооспермії за даними різних авторів є інфекція геніталій, ендокринна патологія, варикоцеле, генетичний фактор, токсиканти органічної та неорганічної природи [14, 48, 56].

Причинами низької ефективності діагностики та лікування чоловіків із різними типами азооспермії є не тільки відсутність чітких уявлень про етіологію та патогенез, але й недостатній обсяг досліджень. Розкриття особливостей генезу різних типів азооспермії можна досягнути уточненням дефектності сперматогенного епітелію, вивченням гормонального дисбалансу, порушення функціонування регуляторних систем клітини, цитогенетичних змін.

Розширення діапазону діагностичних можливостей із розвитком молекулярно-генетичних, біохімічних та імунологічних методів досліджень сприяє з'ясуванню причин порушень сперматогенезу на геномному та постгеномному рівнях.

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.

Вік хворих, яким проводили клініко-діагностичні дослідження та біопсію яєчок варіював в межах 22 – 48 років. Середній вік хворих з приводу тестикулярної (секреторної) неплідності складав 28,6 років, а з приводу

посттестикулярної (екскреторно-обтураційної) – 31,5 років. Середній термін неплідності склав 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.

Серед 69 хворих із секреторною формою неплідності з різними формами гіпогонадізму 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 склав  $22,3 \pm 2,1$  см<sup>3</sup>, при діапазоні від 18,3 до 25,1 см<sup>3</sup>. У групі з азооспермією об'єм яєчок в середньому склав  $16,7 \pm 1,7$  см<sup>3</sup>, в діапазоні від 12 до 21,1 см<sup>3</sup>. У чотирьох чоловіків з нормозооспермією об'єм яєчок був менше 18 см<sup>3</sup>. Ці дані певною мірою погоджуються з такими отриманими в результаті пальпації де показано, що в нормі об'єм яєчок повинен бути не менше 15 см<sup>3</sup> [10]. Менший 15 см<sup>3</sup> вважаються гіпоплазією, а менший 6 см<sup>3</sup> - атрофією. У нормі довжина яєчка - 4–5 см, товщина - 2,5–3 см. Довжина менше 3 см – гіпоплазія. Коли консистенція яєчок напружена, еластична, вони чутливі – ознака задовільного сперматогенезу. М'які, мляві, нечутливі – ознака порушеної центральної регуляції функції яєчок; щільні – ознака первинного порушення функцій яєчок [10].

Аналіз різних груп пацієнтів із необструктивною формою азооспермії показав, що серед 23 чоловіків (група 1) із первинним гіпергонадотропним гіпогонадізмом – 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 (від 18 до 37 мм).

Важливе діагностичне значення мають гемодинамічні показники паренхіматозного кровотоку яєчок в інфертильних чоловіків, що отримані за допомогою ультразвукової доплерографії. Середнє значення лінійної швидкості кровотоку (ЛШК) в артеріях паренхіми у чоловіків із нормозооспермією справа складало  $0,107 \pm 0,015$  м/с, а зліва —  $0,103 \pm 0,012$  м/с. При азооспермії середнє значення ЛШК справа складало  $0,086 \pm 0,012$  м/с, а зліва —  $0,084 \pm 0,008$  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 та заключення спермограми було встановлено наявність необструктивної форми азооспермії.

При гістологічному дослідженні тканини яєчка пацієнтів з НОА у всіх зразках виявлено зміни у звивистих сім'яних каналцях. 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 одного (4,3 %) чоловіка з вірусним орхітом в анамнезі в гістологічному заключенні зазначено – стінка всіх каналців потовщена та склерована, 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 каналцях наявний лише один клітинний ряд, побудований із витягнутих перпендикулярно до базальної мембрани клітин Сертолі, які розташовані



паралельно одна до одної. Просвіт каналців порожній. Лише в поодиноких каналцях 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 урологічного анамнезу.

У групі 2 у чотирьох (21,0 %) пацієнтів гістологічний аналіз показав, що у каналцях наявна зменшена рядність герміногенних клітин, представлених здебільшого сперматогоніями і сперматоцитами. Зрілих клітин кінцевих стадій сперматогенезу не виявлено. У інших 15 (79,0 %) пацієнтів гістологічна картина практично аналогічна. Майже в усіх каналцях наявний лише один клітинний ряд, побудований із витягнутах перпендикулярно до базальної мембрани клітин Сертолі. Просвіт каналців порожній і лише в поодиноких каналцях 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 каналців були потовщеними та склерозованими, в стромі спостерігався фокальний фіброз.

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

Серед 23 пацієнтів (група 4) з нормогонадотропним гіпогонадізмом, двоє (8,7 %) до 3-річного віку були оперовані з приводу двобічного крипторхізму, двоє (11 %) перенесли операцію Бергмана з однієї сторони, один (4,3 %) – операцію Іванісеви́ча, один (4,3 %) – в неонатальний період отримувач високі

доза кортикостероїдів із приводу проблем із диханням, один (4,3 %) – працював з потенційно шкідливими факторами на виробництві, інші 16 (69,7 %) пацієнтів андрологічний анамнез заперечують. У восьми (34,8 %) пацієнтів констатовано гіпоплазію яєчок (включно з тими, котрі перенесли орхопексію, орхіт, два з необтяженим анамнезом). 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 решта 20 (40,0 %) будь-які, вражаючи фетильність фактори в анамнезі заперечували.

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 позалегеневиий 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.

Різноманітність факторів, що негативно впливають на сперматогенез, починаючи від перенесеного в дитинстві епідемічного паротиту, варикоцеле чи крипторхізму до запальгних процесів у пацієнтів із ОА підкреслює поліетіологічність азооспермії, необхідність в диференційованому та своєчасному виборі лікувальної тактики.

Тут слід відмітити, що ефективність тестикулярної біопсії як інструменту діагностування причин азооспермії і предиктора успіху допоміжних репродуктивних технологій дискутується [147].

Біопсія яєчка є травматичним методом та отримати зразки тестикулярної тканини набагато складніше ніж забір крові для досліджень. Тому існує потреба в пошуках інших біомаркерів сперматогенезу, зокрема у венозній крові.

Проведені дослідження показали, що гормональні та метаболічні зміни у крові та сім'яній плазмі є важливими факторами в розвитку азооспермії і вони тісно взаємопов'язані. Для визначення стану гіпоталамо-гіпофізарно-тестикулярної системи, що відповідає за гормональну регуляцію сперматогенезу, досліджували гормональний статус пацієнтів. Так, при НОА, перспективним для терапії станом є гіпогонадотропний гіпогонадізм – ендокринне захворювання, що характеризується недостатністю сперматогенезу внаслідок відсутності його стимуляції гонадотропінами.

В основі такого секреторного непліддя лежать різні форми гіпогонадізму. Первинний гіпогонадізм зустрічається у 98 % випадків, а вторинний у 2 % [10]. Патогенетичним методом лікування секреторного непліддя є гормонотерапія. Однак, для цього потрібне дослідження наявності клініко-лабораторних ознак порушення гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи [10]. При вторинному гіпогонадізмі, вродженому і набутому, теж може застосовуватись стимульована і замісна терапія гонадотропінами [10].

Отримані нами дані свідчать, що у 23 пацієнтів (група 1) з первинним гіпергонадотропним гіпогонадізмом рівень ФСГ у крові вищий норми. У групі 2 (із секреторно-ендокринною неплідністю (гіпергонадотропний гіпогонадізм, ізольоване підвищення ФСГ) рівень ФСГ у 2 рази нижчий в порівнянні з групою 1. У групі 3 у пацієнтів із секреторно-ендокринною неплідністю (гіпергонадотропний гіпогонадізм, ізольоване підвищення ЛГ) рівень ФСГ нормальний. При секреторній неплідності з нормогонадотропним гіпогонадізмом (група 4) рівень ФСГ найнижчий із чотирьох груп.

Рівень ЛГ у групі 1 при секреторно-ендокринній неплідності (гіпергонадотропний гіпогонадізм, підвищений ФСГ і ЛГ) був вищим норми. В групі 2 при секреторно-ендокринній неплідності (гіпергонадотропний гіпогонадізм, ізольоване підвищення ФСГ), в групі 3 при секреторно-

ендокринній неплідності (гіпергонадотропний гіпогонадизм, ізольоване підвищення ЛГ), у групі 4, у пацієнтів із секреторною неплідністю при нормогонадотропному гіпогонадизму рівень ЛГ був в межах норми і складав  $(4,80 \pm 0,52) - (8,65 \pm 0,15)$  МО/мл.

Щодо тестостерону, то в сироватці крові груп 1-4 його рівень був у межах норми. Лише у трьох (16,7 %) пацієнтів групи 1 спостерігався знижений рівень тестостерону. У п'яти (33,3 %) пацієнтів групи 2 теж спостерігався рівень тестостерону ближчий до нижньої межі норми. Хоча ці концентрації здебільшого знаходяться в широких межах норми (5,76-33,0 нмоль/л) за даними ряда дослідників при необструктивній азооспермії вони в середньому в три рази нижчі показників при нормозооспермії [211].

Концентрація естрадіолу в сироватці крові усіх досліджуваних груп знаходилась в межах норми, однак вище середніх показників. За даними інших дослідників ці показники теж в середньому у півтора раза вище норми [211].

Концентрація пролактину в крові пацієнтів усіх груп теж знаходилась в межах норми. Лише в одного (4,3 %) пацієнта із 23 групи 1 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 - зростає 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 – зростає 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 заниженою – 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 зворотно пропорційно корелює з вираженістю порушення сперматогенезу.

При екскреторно-обтураційній неплідності (обструктивна форма азооспермії) всі рівні досліджуваних гормонів знаходились в межах норми. При запальному генезі цієї форми азооспермії лікування проводиться в два етапи: 1 - комплексна протизапальна терапія; 2 – пластична хірургія (операція на сім'явивідних шляхах). Операцію призначають тільки після визначення рівнів ФСГ і Т в крові і за результатами біопсії яєчок, що повинно свідчити про збереження/незбереження сперматогенезу [10].

Як свідчать результати проведених досліджень концентрації досліджуваних гормонів у всіх досліджуваних групах відрізняються, внаслідок чого виникає гормональний дисбаланс. А достатній рівень кожного гормону робить свій внесок у процес сперматогенезу та формування сперматозоїдів.

Отримані власні та літературні дані свідчать, що окрім гістологічного аналізу біоптатів яєчок, інгібін В є найбільш важливим біохімічним маркером оцінки сперматогенезу при необструктивній формі азооспермії.

Нами виявлено, що рівень цього гормону 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 є альтернативою біопсії для диференційної діагностики непліддя чоловіків.

Згідно сучасних уявлень, розвиток патологічних процесів в організмі спричиняється оксидативним стресом і супроводжуються порушенням механізмів антиоксидантного захисту клітин [14, 18]. Здебільшо оксидативний стрес спричиняється хронічними запальними процесами передміхурової залози [10]. АФК є тригерами запуску апоптичних подій, які потім посилюються ендогенними редокс-реакціями у сім'яній рідині. Розвиток оксидативного стресу та запуск пероксидації ліпідів призводить до морфологічних змін сперматогенного епітелію сім'яних каналців, порушення всіх етапів сперматогенезу. Вплив АФК на клітини сперматогенезу небезпечний ще й тим, що антиоксидантна система в них розвинута слабо і є дуже чутливою. В результаті дії АФК відбувається ще й фрагментація ДНК. Все це, своєю чергою, призводить до непліддя.

Важливе місце серед антиоксидантної системи клітини займає система глутатіону, компоненти якої приймають участь як в ензиматичних (глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіонтрансфераза), так і в неензиматичних (глутатіон) реакціях АОС. Каталітична активність ензимів антиоксидантної системи, що регулює рівень процесів вільнорадикального окиснення в клітинах, забезпечує підтримання гомеостазу їх плазматичних мембран і внутрішньоклітинних структур в умовах оксидативного стресу [137, 148, 161, 166]. Найбільш активним антиоксидантом (ензимом), що нейтралізує АФК є глутатіонпероксидаза в активному центрі якої розташований селен.

Нами проведено порівняльне дослідження процесів ПОЛ і системи глутатіону в сім'яній плазмі і в сироватці крові чоловіків із встановленим діагнозом азооспермія. В сім'яній плазмі пероксидація ліпідів була більш вираженою.

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, як біомаркера пероксидації ліпідів, у сім'яній плазмі при необструктивній азооспермії зростала в 1,5 раза щодо нормозооспермії. Загальна антиоксидантна активність при НОА знижувалась 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 є співвідношення відновленого глутатіону до окисненого в спермальній плазмі: при нормозооспермії – 1,5, а при НОА – 0,9.

При вивченні окремих неензиматичних компонентів глутатіонової антиоксидантної системи в сироватці крові було з'ясовано, що загальна антиоксидантна активність при НОА знижувалась в 1,2 раза. Концентрація відновленого глутатіону знижувалась в 1,8 раза, а концентрація загального глутатіону знижувалась в 1,2 раза. При цьому достовірних змін в концентрації окисненого глутатіону як і у випадку сім'яної плазми не виявлено.

Обчислення редокс-індексу (RI GSH) продемонструвало зниження сумарної потужності даної системи в сім'яній плазмі чоловіків із необструктивною формою азооспермії. В сироватці крові такого зниження не спостерігається. Однак різке зниження концентрації відновленого глутатіону і його співвідношення до окисненого глутатіону в сироватці крові свідчить про посилене його використання як у сім'яній плазмі, так і в крові.

Одночасно з активацією пероксидації ліпідів виявлено достовірне зниження активності глутатіонпероксидази щодо контрольних значень у пацієнтів з НОА, 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 вона достовірно знижується, в 1,2 раза.

Дані літератури також свідчать про зниження активності GP у сім'яній рідині неплідних чоловіків з азооспермією. Підтвердженням слугують і результати функціонування глутатіонпероксидазної системи при порушенні фертильності чи інших патологічних станах, які супроводжуються присутністю високих концентрацій АФК [110, 161, 166]. В цілому, тезу про виснаження компенсаторних механізмів глутатіонової антиоксидантної системи та підвищення інтенсивності ліпопероксидних процесів при НОА підтверджують і інші дослідники [163, 166, 169].

Аргіназо-NO-синтазна система приймає участь в регуляції практично всіх внутрішньоклітинних процесів, включаючи проліферації та диференціацію клітин. Продукування NO відбувається в результаті окиснення L-аргініна атомом кисню за участю специфічного ензиму NO-синтази. NO синтезують самі різні клітини організму – лімфоцити, нейтрофіли, тромбоцити, макрофаги тощо. Оксид азоту, що продукується в NO-синтазній реакції регулює процес сперматогенезу, впливає на життєздатність та рухливість сперматозоїдів. В уrogenітальному тракті забезпечує розвиток пенальної ерекції.

В результаті проведених нами експериментів з'ясовано, що при НОА в сім'яній плазмі аргіназна активність в 1,5 раза нижча ніж при нормозооспермії.

Встановлено, що при НОА активність cNOS в сім'яній плазмі 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. Ці дані погоджуються з іншими де показано зростання



експресії iNOS клітинами Сертолі та клітинами Лейдіга при азооспермії, що засвідчує важливу роль iNOS в сперматогенезі [98].

Важливим шляхом інактивації високих концентрацій NO є його взаємодія з супероксидним аніоном із утворенням сильного окиснювача пероксинітриду. Ця сполука спричиняє окисне пошкодження протеїнів, ліпідів, нуклеїнових кислот.

Ми виокремили найбільш суттєві предиктори імовірності розвитку непліддя. А це рівні активності iNOS та аргінази, зокрема 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 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 концентрації  $\text{NO}_2^-$  у 1,6 раза ( $p < 0,01$ ). Щодо  $\text{NO}_3^-$ , то його концентрація достовірно зростала, в 1,5 раза ( $p < 0,01$ ). Важливо відмітити, що при азооспермії суттєво зростає співвідношення  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ , у 4,9 раза. В той час як у нормі це співвідношення дорівнює 2,0 раза. Відомо, що не тільки сам оксид азоту, але й його похідні здійснюють важливі фізіологічні функції, беруть участь в регуляції апоптозу, ангіогенезу, вільнорадикальних процесів.

В цілому, отримані нами результати вказують на порушення аргіназо-NO-синтазної системи в сім'яній плазмі, що призводять до дисбалансу регуляторних систем, зокрема регуляторної функції NO. Припускається, що NO, що утворюється у надмірній кількості, при патологічних станах організму, має виражену цитотоксичну дію внаслідок утворення пероксинітриду [84, 207, 209].

Окрім оксиду азоту, іонізований  $\text{Ca}^{2+}$  також відіграє ключову роль в регуляції практично всіх внутрішньоклітинних процесів, включаючи проліферацію та диференціацію клітин, апоптоз тощо [72, 78, 100, 108]. Важлива роль у підтриманні внутрішньоклітинного гомеостазу  $\text{Ca}^{2+}$  відводиться

$\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазі плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму, функція яких полягає у зниженні концентрації даного іону в цитозолі.

Оскільки  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази є тільки мембранозв'язаними ензимами і, зрозуміло, відсутні в сім'яній плазмі, нами досліджені активності  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази плазматичної мембрани лімфоцитів практично здорових чоловіків, а також хворих на азооспермію. Як відомо, лімфоцити на рівні з нервовою системою дуже швидко реагують на любі впливи на організм і їх використовують в якості «метаболічного дзеркала» організму. Зміни імунних і біохімічних характеристик лімфоцитів свідчать про розвиток патологічних процесів, перебіг захворювання чи ефективність лікування [4].

Встановлено, що  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазна активність плазматичної мембрани лімфоцитів крові практично здорових чоловіків із нормозооспермією та у пацієнтів з ОА достовірно не відрізняються ( $p > 0,05$ ). При НОА активність цього ензиму знижувалась в 1,5 раза. Зниження  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності плазматичної мембрани лімфоцитів крові пацієнтів з НОА свідчить про зростання  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  у цитозолі лімфоцитів.

Достовірне зниження  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності щодо нормозооспермії спостерігається тільки при НОА ( $p < 0,05$ ).

Зниження  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФазної активності плазматичної мембрани і мембран ЕПР лімфоцитів крові пацієнтів з НОА свідчить про зростання  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  у цитозолі лімфоцитів, тобто перевантаження їх іонізованим  $\text{Ca}^{2+}$ . Зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  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 (5,6 %) 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 (трансмембранний регуляторний білок муковісцидозу), що ймовірно стало причиною агенезії ductus deferens. У 45 (90,0 %) пацієнтів із каріотипом 46 XY у досліджуваних ділянках Y-хромосоми мікрodelецій не виявлено. Дані літератури свідчать, що мікрodelеції довгого плеча Y-хромосоми (делеції AZF - azoospermia factor, фактор азооспермії), виявляється з частотою 1:1000-1500 чоловіків і вони вважаються одними з найчастіших генетичних причин важких форм порушення сперматогенезу [207, 212]. Дані щодо кореляції між типом AZF-делецій, стадією та ступенем порушення сперматогенезу, прогностичною значимістю мутацій гена для екстракції сперматозоїдів із сім'яників не однозначні [101, 105]. Аналізованих мутацій гена ТРБМ теж не виявлено.

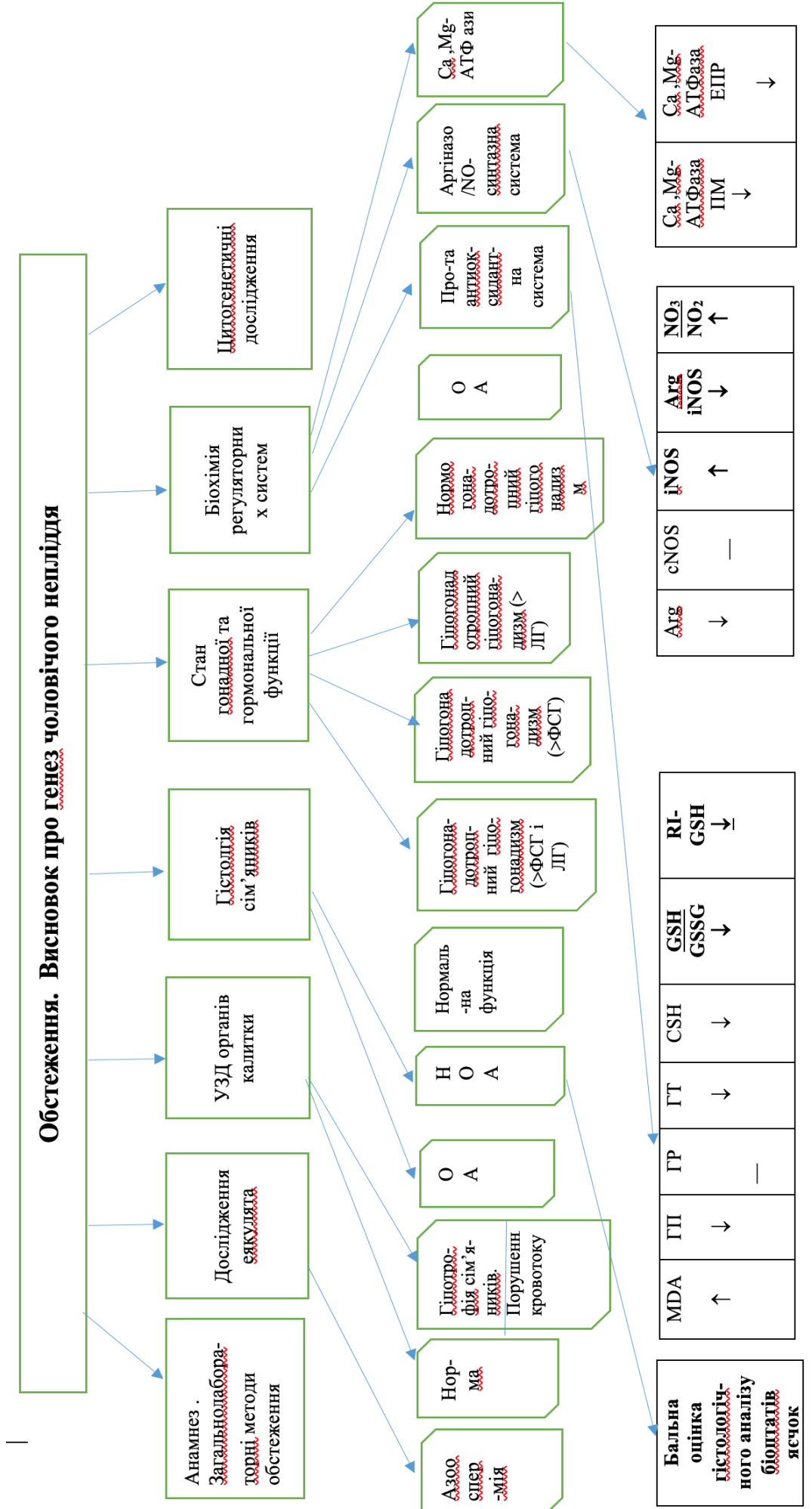
Слід відмітити, що серед хромосомних аномалій при азооспермії часто виявляються зміни кількості статевих хромосом, і структурні перебудови аутосом чи Y-статевої хромосоми. Термін «мікрodelеція хромосоми Y» означає відсутність локусу AZF (фактора азооспермії, azoospermia factor) або його субрегіонів (AZFa, AZFb, AZFc), що зумовлює порушення сперматогенезу різного ступеня в залежності від розміру та локалізації делеції [94, 101, 105, 119].

Щодо гена ТРБМ, то вивчення його мутацій пов'язано з тим, що муковісцидоз є найпоширенішим аутосомно-рецесивним захворюванням в Західному регіоні України, причиною якого є спадкові мутації в межах цього гена. Мутації гена ТРБМ можуть по-різному впливати на формування фенотипу, зокрема щодо неплідності.

Таким чином, на основі результатів проведених досліджень розроблений діагностичний алгоритм інфертильних чоловіків з азооспермією (табл. 6.1). З'ясовано, що при необструктивній формі азооспермії відбуваються не тільки морфофункціональні зміни в сім'яниках чи гормональному дзеркалі, але й біохімічні зміни в сім'яній плазмі і меншою мірою в сироватці та лімфоцитах крові. Особливо ці зміни проявляються в порушенні регуляторних систем клітини – про- та антиоксидантної, аргіназо-NO-синтазної та  $Ca^{2+}$ -залежної АТФ-гідролазної.

Таблиця 6.1

**Діагностичний алгоритм інфертильних чоловіків з азоспермією**



Важливими додатковими показниками азооспермії можуть бути зростання в сім'яній плазмі активності індукцибельної ізоформи NO-синтази, співвідношення відновленого глутатіону до окисненого, регуляторний індекс відновленого глутатіону, співвідношення активності аргінази до індукцибельної ізоформи NO-синтази, а також співвідношення метаболітів оксиду азоту –  $\text{NO}_3^-$  /  $\text{NO}_3^-$ .

## ВИСНОВКИ

У дисертації наведене теоретичне узагальнення і нове вирішення актуального медико-соціального завдання – з'ясування патогенетичних особливостей інфертильних чоловіків із серторно-ендокринною та екскреторно-обтураційною формами азооспермії шляхом аналізу порушень гемодинаміки яєчок, гістологічного дослідження сім'яних каналців, гормональних, біохімічних і цитогенетичних показників фертильного потенціалу, що має суттєве значення для охорони здоров'я.

1. Вперше виявлено, що аргіназна активність в сім'яній плазмі пацієнтів із необструктивною формою азооспермії в 1,5 раза нижче ніж при нормозооспермії ( $p < 0,05$ ). Достовірних змін в аргіназній активності при обструктивній формі азооспермії щодо контрольних значень не виявлено.
2. Вперше виявлено, що при НОА активність сNOS в сім'яній плазмі в 1,2 раза нижче контрольних значень ( $p < 0,05$ ), а активність іNOS вище контролю в 17,7 раза ( $p < 0,001$ ).
3. Вперше показано достовірне зниження концентрації метаболіту  $\text{NO} - \text{NO}_2^-$  в 1,6 раза ( $p < 0,01$ ) щодо контрольних величин. Концентрація іншого метаболіту –  $\text{NO}_3^-$  при необструктивній азооспермії зростає в 1,5 раза ( $p < 0,01$ ).
4. Доведено, що при НОА активності  $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФаз плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму лімфоцитів крові достовірно знижуються, в 2,2 та 1,3 раза ( $p < 0,01$ ), відповідно, що свідчить про перевантаження клітин  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .
5. В результаті цитогенетичного аналізу виявлено генетичні зміни у 5,5 % пацієнтів із нормогонадотропним гіпогонадізмом (каротип 46 XY, 9ph) і у 15,7 % пацієнтів із екскреторно-обтураційною неплідністю (ОА) (каротип 46 XY (4) (p152q12)). У 2,6 % пацієнтів виявлено, що вони є

гетерозиготами за мутацією F508del гена Трансмембранного регуляторного білка муковісцидозу.

6. У групах чоловіків із гіпергонадотропним гіпогонадизмом і нормогонадотропним гіпогонадизмом концентрації ФСГ, ЛГ та тестостерону в сироватці крові достовірно відрізнялись між собою, що вказує на показники азооспермії – пошкодження тестикулярної тканини яєчок, порушення гіпоталамо-гіпофізарної системи чи гіперпролактинемія. Продемонстровано, що за нормозооспермії концентрація інгібіну В у сироватці крові пацієнтів нижча за норму 2,7 раза ( $p < 0,001$ ).
7. Виявлено, що при НОА в сім'яній плазмі відбуваються достовірно зростання інтенсивності процесів пероксидації ліпідів в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ), зниження концентрації відновленого глутатіону в 1,8 раза ( $p < 0,05$ ), зниження співвідношення відновленого до окисненого глутатіону в 1,7 раза, а також зниження активності всіх глутатіонзалежних ензимів, в 1,2 – 1,3 раза ( $p < 0,05$ ), що є однією із ланок патогенезу і свідчить про зниження активності антиоксидантної системи.
8. Гістологічний аналіз біоптатів яєчок пацієнтів із різними видами неплідності при секреторній формі азооспермії (гіпергонадотропний гіпогонадизм, нормогонадотропний гіпогонадизм) свідчить про відмінності в порушенні сперматогенного епітелію сім'яних каналців і зупинку сперматогенезу на різних стадіях, максимально на рівні сперматогоній.
9. Виявлено, що при секреторній формі азооспермії величина лінійної швидкості паренхіматозного артеріального кровотоку в яєчках чоловіків вірогідно знижувалась, в 1,3 раза менша щодо нормозооспермії ( $p < 0,05$ ), що супроводжувалось зменшенням об'єму яєчок в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ) та зниженням еластичності яєчка в 1,8 раза ( $p < 0,05$ ) за результатами якісної компресійної соноеластографії.

10. Показано, що найбільш вірогідними показниками НОА можуть бути зростання концентрації ФСГ (тільки при гіпергонадотропному гіпогонадизмі), зростання інгібіну В в 2,7 раза ( $p < 0,001$ ), зростання активності індукцибельної ізоформи NO-синтази в 17,7 раза ( $p < 0,001$ ), зниження співвідношення відновленого глутатіону до окисненого, зниження редокс-індексу відновленого глутатіону, зниження співвідношення активності аргінази до iNOS та зростання співвідношення  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ . Між об'ємом яєчка, концентраціями в сироватці крові інгібіна В та ФСГ, активностями аргінази та індукцибельної NO-синтази виявлені високі кореляційні зв'язки. На основі отриманих даних розроблений діагностичний алгоритм інфертильних чоловіків з азооспермією.



## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Беденюк АД, Твердохліб ВВ, Мисак АІ, Нестерук СО. Шляхи поліпшення показників сперматогенезу в комплексному лікуванні чоловічого безпліддя. Здобутки клінічної та експериментальної медицини. 2020;2:83-87.
2. Божедомов ВА. Андрологические аспекты организации помощи бездетным парам. Вестник урологии. 2015;1:24-34.
3. Виноградов ИВ, Виноградова ЛМ, Базанов ПА, Юткин ЕВ. Лечение мужского бесплодия, обусловленного высокой степенью фрагментации ДНК сперматозоидов. Проблемы репродуктологии. 2014;3:67-72.
4. Воробець ДЗ, Кочешкова НС. Неплідність та еректильна дисфункція чоловіків: біохімічні та клінічні аспекти. Тернопіль: Укрмедкнига. 2008. 204 с.
5. Гамидов СИ, Овчинников РИ, Попова АА. Необструктивная азооспермия – клинические рекомендации. РМЖ. 2015;11:595-606.
6. Гасанов НГ, Гамидов СИ, Шатылко ТВ и др. Репродуктивный потенциал сперматозоидов, полученных хирургическим путем у пациентов с азооспермией. Урология. 2019;3:126-132.
7. Гасанов НГ, Гамидов СИ, Шатылко ТВ и др. Роль пункционной биопсии яичка в ведении пациентов с азооспермией. Исследование и практика в медицине. 2020;7(3):43-50.
8. Глыбочко ПВ, Аляев ЮГ, Чалый МЕ, Ахвледиани НД. Половые расстройства у мужчин. М.: Сер. Библиотека врача-специалиста. Урология–андрология. 2012. 112 с.
9. Горпинченко П, Воробець ДЗ. Механізми розвитку сексуальної дисфункції. Львів: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького. 2013. 388 с.
10. Горпинченко П, Гуженко ЮМ, Імшенецька ЛП. Надання медичної допомоги хворим з чоловічим фактором безпліддя подружньої пари. Здоров'я чоловіка. 2014;4(51):137-149.

11. Горпинченко ИИ, Нуриманов КР, Порошина ТВ, Савченко ВС, Дранник ГН. Проблемы идиопатического мужского бесплодия. Здоровье мужчины. 2016;1:133-137.
12. Горпинченко П, Романюк МГ. Чоловіче безпліддя: етіологія, патлогенез, діагностика та сучасні методи лікування. 2016;1:8-16.
13. Горпинченко П, Романюк МГ, Аксьонов ПВ та ін. Антиоксиданты в терапии мужского бесплодия. 2018; 113-120.
14. Горпинченко П, Романюк МГ. Чоловіче безпліддя: етіологія, патогенез, діагностика та сучасні методи лікування. Здоровье мужчиы. 2016;1(56):8-11.
15. Гуженко ЮМ, Куценко АО. Особливості порушень сперматогенезу чоловіків із безпліддям залежно від застосованих методик допоміжних репродуктивних технологій. Семейная медицина. 2016;5:132-137.
16. Демяшкин ГА. Апоптоз в семенных канальцах человека в норме и при идиопатическом бесплодии. Цитология. 2018;3:35-41.
17. Демяшкин ГА. Идиопатическое мужское бесплодие: иммуногистохимический анализ экспрессии плюрипотентных белков. Журнал анатомии и гистопатологии. 2015;62(3):39-42.
18. Демяшкин ГА. Новые подходы диагностики мужского бесплодия: анализ биоптатов яичка с нормальным и нарушенным сперматогенезом. Вестник медицинского института «РЕАВИЗ». 2016;2:170-183.
19. Демяшкин ГА, Коган ЕА, Демура ТА. Тканевой ингибин-В – маркер сперматогенеза. 2016;14(4):43-50.
20. Дубова ЕА и соавт. Морфологическая характеристика биоптатов яичка при бесплодии. Архив патологии. 2012;6:8-12.
21. Евдокимов ВВ, Жуков ОБ, Бабушкина ЕВ. Анализ параметров эякулята у мужчин в различных возрастных группах. Андрология и генитальная хирургия. 2016;17(2):65-67.

22. Епанчинцева ЕА, Селятицкая ВГ, Митрофанов ИМ, Пинхасов ББ и соавт. Антиспермальные антитела при мужском бесплодии, связь с абдоминальным ожирением. Успехи современного естествознания. 2015;4:24-27.
23. Жуков ОБ, Юрченко ОВ, Кырпа ВИ, Жуков АА. Ультразвуковая соноэластография мошонки в диагностике фертильности мужчины. Андрология и генитальная хирургия. 2014;2:58-62.
24. Жуков ОБ, Астафьева ЛИ, Блинова СВ. Бесплодие у мужчин с гипергонадотропным гипогонадизмом. Андрология и генитальная хирургия. 2017;18(18):70-75.
25. Кадыров ЗА, Москвичев ДВ, Астахова МА. Прогностическая значимость ингибина В у инфертильных пациентов (обзор литературы). Андрология и генитальная хирургия. 2015;1:8-15.
26. Карпищенко АИ. Медицинские лабораторные технологии. Справочник в 2-х томах. Санкт-Петербург: Интермедицина. 2002. 600 с.
27. Касатонова ЕВ, Ефремов ЕА, Мельник ЯИ, Залетова ВВ и соавт. Опыт применения микрохирургической биопсии яичка и его придатка у пациентов с необструктивной азооспермией. Экспериментальная и клиническая урология. 2014;4:38-42.
28. Кульченко НГ. Влияние оксидативного стресса на репродуктивное здоровье мужчин. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2016;4:12-18.
29. Кульченко НГ. Оксидативный стресс в развитии необструктивной азооспермии. Трудный пациент. 2017;4-5(15):44-46.
30. Кульченко НГ, Демяшкин ГА. Морфологические изменения в ткани яичка при бесплодии. Андрология и генитальная хирургия. 2016;3(17):45-49.
31. Кульченко НГ, Костин АА, Самсонов ЮВ, Демяшкин ДА, Москвичев ДВ. Прогнозирование резервной функции яичек у пациентов с необструктивной азооспермией. Исследования и практика в медицине. 2016;3(3):42-48.
32. Курило ЛФ, Сорокина ТМ, Матюшенко ГН, Евдокимов ВВ и соавт. Влияние бессимптомных инфекций уrogenитального тракта на показатели эякулята у

- мужчин с бесплодием и варикоцеле. Андрология и генитальная хирургия. 2016;17(2):98-103.
33. Лаповець ЛЄ, Луцик БД, Лебедь ГБ. Клінічна лабораторна діагностика: навч. посібник. Київ: Медицина. 2018. 288 с.
34. Ломтева СВ, Савкина КГ, Шестель АН, Сагамонова КЮ. и соавт. Окислительный стресс и мужская репродуктивная система. Валеология. 2015;1:59-67.
35. Максимюк В, Максимюк Г, Воробець З. Клітина, середовище, гомеостаз. Львів: СПОЛОМ. 2021. 315 с.
36. Макух ГВ. Алгоритм молекулярно-генетичного аналізу гена ТРБМ для практичної діагностики муковісцидозу. Лабораторна діагностика. 2011;2(56):14-18.
37. Моин ВМ. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. Лаб. дело. 1986;12:124–126.
38. Некрасова ИЛ, Шестакова ВГ, Иванов АГ, Артамонов АА. Исследование фрагментации ДНК сперматозоидов в диагностике мужского бесплодия. Верхневолжский медицинский журнал. 2015;3:42-44.
39. Никитин ДМ, Ракевич МВ. Этиопатогенетическая роль метаболического синдрома в развитии мужского бесплодия (обзор литературы). Репродуктивное здоровье. Восточная Европа. 2015;4(40):93-103.
40. Никифоров ОА, Ломейко ЕА, Ломака СВ, Лавыш ИА. Мужское бесплодие: актуальные вопросы физиологии, этиопатогенеза и диагностики нарушений репродуктивной системы у мужчин. Запорожский медицинский журнал. 2014;4(85):69-76.
41. Пашкова ЕЮ, Калинченко СЮ. Мужское бесплодие в XXI веке –реалии и перспективы. Новые возможности использования комбинированной стимулирующей терапии гонадотропинами. Эффективная фармакотерапия. 2013;1:26-31.

42. Пилип ЛЯ, Спыненко ЛО, Зукін ВД, Білько НМ. Хромосомні аномалії у чоловіків із різним ступенем порушення сперматогенезу. Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Медицина. 2013;4(1):14-22.
43. Раваєва МЮ, Чуян ОМ. Зміна активності системи синтезу оксиду азоту під дією низькоінтенсивного міліметрового випромінювання. Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія «Біологія, хімія». 2011;4(4):201–210.
44. Ракевич МВ. Методы консервативного лечения мужского бесплодия. Медицинские новости. 2016;9(264):13-17.
45. Романюк МГ, Корниенко АМ, Аксенов ПВ. Актуальные вопросы гормональной стимуляции сперматогенеза при мужском бесплодии. Здоровье мужчины. 2015;1(52):121-124.
46. Руднева СА, Брагина ЕЕ, Арифудин ЕА, Сорокина ТМ и соавт. Фрагментация ДНК в сперматозоидах и ее взаимосвязь с нарушением сперматогенеза. Андрология и генитальная хирургия. 2014;4:34-40.
47. Руководство ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью. ВОЗ. 2010. 5-е изд.
48. Сухих ГТ, Божедомов ВА. Мужское бесплодие. М.: Эксмо. 2009. 240 с.
49. Тер-Аванесов ГВ и соавт. Бесплодный брак. Современные подходы к диагностике и лечению. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2010. Гл. 7:324-411.
50. Тимирбулатов РА, Селезнев ЕИ. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение. Лабораторное дело. 1981;4:209–211.
51. Фафула РВ, Воробець ЗД. Біохімічні механізми порушень запліднювальної здатності сперматозоїдів інфертильних чоловіків. Медична та клінічна хімія. 2019;3(80):247-248.
52. Фафула РВ, Онуфрович ОК, Єфремова УП, Воробець ДЗ, Воробець ЗД. Особливості аргіназного шляху метаболізму L-аргініну в сперматозоїдах

чоловіків при різних формах патоспермії. Фізіологічний журнал. 2016;62(5):83-90.

53. Фафула РВ, Онуфрович ОК, Єфремова УП, Наконечний ЙА, Воробець ЗД. Інтенсивність процесів ліпопероксидації у сперматозоїдах чоловіків із порушенням фертильності. Вісник проблем біології медицини. 2017;1 (135):199-204.

54. Фафула РВ, Єфремова УП, Онуфрович ОК та ін. Кінетичні властивості NO-синтази сперматозоїдів інфертильних чоловіків. Медична та клінічна хімія. 2019;21(1):49-54.

55. Цветкова П, Бабюк И, Иванова С, Илиева И. Цитогенетическое исследование еякулята при мужском бесплодии. Здоровье мужчины. 2012;3:116-117.

56. Чалый МЕ, Ахвеледиани НД, Харчилава РР. Мужское бесплодие. Урология. 2016;1:2-17.

57. Шуляк ОВ. Інфекції сечостатевих шляхів: пієлонефрит. Укр. мед. часопис. 2014;4(102):32-41.

58. Юшко ЕИ, Жуковская СВ, Игнатьева ТВ, Линник АИ. Оценка результатов тестикулярной биопсии и криоконсервации биоптата в программе лечения мужского бесплодия. Здравохранение. 2010;8:63-66.

59. Abdulwahed SR, Mohamed EE, Taha EA, Saleh MA et al. Sensitivity and specificity of ultrasonography in predicting etiology of azoospermia. Urology. 2013;81(5):967-971.

60. Adamopoulos DA, Koukkou EG. Value of FSH and inhibin-B measurements in the diagnosis of azoospermia - a clinician's overview. Int J Androl. 2010;33:109-113.

61. Adriansjah R, Kusumajaya C, Wijayanti Z. Successful testicular sperm extraction in infertile male with non-obstructive azoospermia presented with bilateral atrophic testis: a case report. Urology Case Reports. 2020;33:101-116.

62. Agarwal A., Hamada, S.C. Esteves S.C Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1. Nat Rev Urol. 2012;9(12):678-90.

63. Agarwal A, Sharma R, Durairajanayagam D et al. Spermatozoa protein alterations in infertile men with bilateral varicocele. Asian J Androl. 2015;5:22-26.

64. Aitken RJ. Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. *Reproduction*. 2020;159:189–201.
65. Aitken R, Koppers A. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl*. 2011;13:36–42.
66. Aksglaede L, Juut A. Testicular function and fertility in men with Klinefelter syndrome: a review. *Eur J Endocrinol*. 2013;68(4):R67-76.
67. Althakafi SA, Mustafa OM, Seyam RM et al. Serum testosterone levels and other determinants of sperm retrieval in microdissection testicular sperm extraction. *Transl Androl Urol*. 2017;6(2):282-287.
68. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*, 3rd ed. E. Nieschlag, H.M. Behre, S. Nieschlag (eds.). Springer. 2010. 629 p.
69. Aston KI. Genetic susceptibility to male infertility: news from genome-wide association studies. *Andrology*. 2014;2(3):315-321.
70. Atig F, Raffa M, Habib B-A et al. Impact of seminal trace element and glutathione levels on semen quality of Tunisian infertile men. *BMC Urology*. 2012;12:6-17.
71. Aziz N. The importance of semen analysis in the context of azoospermia. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013;68(1):35-38.
72. Baker K, Sabanegh JrE. Obstructive azoospermia: reconstructive techniques and results. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013;68(1):61-73.
73. Barati E, Nikzad H, Karimian M. Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(1):93-113.
74. Barbotin A.L., Ballot C., Sigala J., Ramdane M., Duhamel A., Marcelli F. The serum inhibin B concentration and reference ranges in normozoospermia. *Eur. J. Endocrinol*. 2015;172(6):669-676.
75. Bernie AM, Shah K, Halpern JA et al. Outcomes of microdissection testicular sperm extraction in men with nonobstructive azoospermia due to maturation arrest. *Fertil Steril*. 2015;104:569-573.
76. Berookhim B, Leader B, Copperman A. Characterization of a novel marker of oxidative stress in men from 774 infertile couples. *Fertil. Steril*. 2011;96:165-169.

77. Beyaz CC, Gunes S, Onem K et al. Partial deletions of Y-chromosome in infertile men with non-obstructive azoospermia and oligoasthenoteratozoospermia in a Turkish population. *In Vivo*. 2017;31(3):365-371.
78. Bieniek JM, Drabovich AP, Lo KC. Seminal biomarkers for the evaluation of male infertility. *Asian J Androl*. 2016;18(3):426-433.
79. Binder G, Schweizer R, Blumenstock G, Braun R. Inhibin B plus LH vs GnRH agonist test for distinguishing constitutional delay of growth and puberty from isolated hypogonadotropic hypogonadism in boys. *Clin Endocrinol. (Oxf)*. 2015;82:100-105.
80. Bhardwaj A, Verma A, Majumdar S, Rhanduja KL. Status of vitamin E and reduced glutathione in semen of oligospermic and azospermic patients. *Asian J Androl*. 2000;2(3):225-228.
81. Bo H, Liu Z, Zhu F et al. Long noncoding RNAs expression profile and long noncoding RNA-mediated competing endogenous RNA network in non-obstructive azoospermia patients. *Future Medicine*. 2020;16:2020-2028.
82. Bobjer J, Naumovska M, Giwercman YL et al. High prevalence of androgen deficiency and abnormal lipid profile in infertile men with non-obstructive azoospermia. *Int J Androl*. 2012;35:688-694.
83. Bonomi M, Rochira V, Pasquali D et al. Klinefelter syndrome (KS): genetics, clinical phenotype and hypogonadism. *J Endocrinol Invest*. 2017;40(2):123-134.
84. Bostwick DG. *Urologic surgical pathology*. 3th edition. 2014. 976 p.
85. Bracke A, Peeters K, Punjabi U et al. A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. *Reproductive Medicine online*. 2018;36:327-339.
86. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*. 113: Academic Press. 1985:484-90.
87. Catanzariti F, Cantoro U, Lacetera V, Muzzonigro G et al. Comparison between WHO (World Health Organization) 2010 and WHO 1999 parameters for semen analysis - interpretation of 529 consecutive samples. *Arch Ital Urol Androl*. 2013;85:125-129.



88. Cerván-Martín M, Castilla JA, Palomino-Morales RJ, Carmona FD. Genetic landscape of nonobstructive azoospermia and new perspectives for the clinic. *J Clin Med*. 2020;9(300):1-27.
89. Cissen M, Meijerink AM, D'Hauwers KW et al. Prediction model for obtaining spermatozoa with testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. 2016;31:1934-1941.
90. Cito G, Becatti M, Natali A et al. Redox status assessment in infertile patients with non-obstructive azoospermia undergoing testicular sperm extraction: a prospective study. *Andrology*. 2019;8(2):364-371.
91. Chakraborty S, Ain R. Nitric-oxide synthase trafficking inducer is a pleiotropic regulator of endothelial cell function and signaling. *J Biol Chem*. 2017;292(16):6600-6620.
92. Chellat D et al. First study of microdeletions in the Y chromosome of Algerian infertile men with idiopathic oligo- or azoospermia. *Urol Int*. 2013;90(4):455-459.
93. Chen H, Luo T, Chen T, Wang G. Seminal bacterial composition in patients with obstructive and non-obstructive azoospermia. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2018;15(3):2884-2890.
94. Choi DK et al. Detection of Y chromosome microdeletion is valuable in the treatment of patients with nonobstructive azoospermia and oligoasthenoteratozoospermia: sperm retrieval rate and birth. *Korean J Urol*. 2013;54(2):111-116.
95. Cocuzza M, Alvarenga C, Pagani R. The epidemiology and etiology of azoospermia. *Clinics*. 2013;68(51):15-26.
96. Colpi GM, Caroppo E. Re: Predictors of surgical sperm retrieval in non-obstructive azoospermia: summary of current literature. *Intern Urol and Nephrol*. 2020;52:2039-2041.
97. Committee on Gynecologic Practice. Committee opinion no. 618: Ovarian reserve testing. *Obstet Gynecol*. 2015;125(1):268-273.
98. Costur P, Filiz S, Gonca S et al. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the azoospermic human testis. *Andrologia*. 2012;44(1):654-660.

99. Darson A, Nishigaki T, Beltran C, Treviño CL. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological Reviews*. 2011;91:1305-1355.
100. Datta A, Nayini K, Eapen A et al. Serum inhibin-b may predict successful sperm retrieval in azoospermic men with normal gonadotropin and testosterone levels. *Human Reproduction*. 2012;27:2-9.
101. Deng Y, Jing F, Zhou N et al. Combined evaluation of serum follicle-stimulating hormone, inhibin B, chromosome karyotyping and AZF microdeletion of Y-chromosome for predicting outcomes of testicular sperm aspiration in azoospermic patients. *Journal of Southern Medical University*. 2014;34(10):1469-1474.
102. Dohle GR, Diemer T, Kopa Z et al. European Association of Urology Working Group on Male Infertility. European Association of Urology guidelines on vasectomy. *Eur Urol*. 2012;61:159-163.
103. Dohle GR, Elzanaty S, van Casteren NJ. Testicular biopsy: clinical practice and interpretation. *Asian J Androl*. 2012;14(1):88-93.
104. Dul EC, Van Echten-Arends J, Groen H et al. Chromosomal abnormalities in azoospermic and non-azoospermic infertile men: numbers needed to be screened to prevent adverse pregnancy outcomes *Human Reproduction*. 2012;27:2850-2856.
105. Eloualid A, Rhaissi H, Reguig A et al. Association of spermatogenic failure with the b2/b3 partial AZFc deletion. *PLoS One*. 2012;7(4):346-351.
106. Esteves SC. Microdissection testicular sperm extraction (micro-TESE) as a sperm acquisition method for men with nonobstructive azoospermia seeking fertility: operative and laboratory aspects. *Int Braz J Urol*. 2013;39:440-446.
107. Esteves SC. Clinical management of infertile men with nonobstructive azoospermia. *Asian J Androl*. 2015;13(2):157-161.
108. European association of urology. Guidelines. 2012. 2014.
109. Fafula RV, Onufrovych OK, Iefremova UP, Melnyk OV, Nakonechnyi IA, Vorobets DZ, Vorobets ZD. Glutathione content in sperm cells of infertile men // *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017;8(2):157-161.

110. Fafula RV, Onufrovych OK, Vorobets DZ, Iefremova UP, Vorobets ZD. Glutathione antioxidant protection system in ejaculated spermatozoa of infertile men with different forms of pathospermia. *Біологічні Студії / Studia Biologica*. 2017;11(1):17-24.
111. Fafula RV, Paranyak NM, Besedina AS, Vorobets DZ, Iefremova UP, Onufrovych OK, Vorobets ZD. Biological significance of glutathione S-transferases in human sperm cells. *Journal of Human Reproductive Sciences*. 2019;12(1):24-28.
112. Faure C, Leveille P, Dupont C et al. Are superoxide dismutase 2 and nitric oxide synthase polymorphisms associated with idiopathic infertility? *Antioxid Redox Signal*. 2014;21:565–569.
113. Fiedz D, Pilatz A, Diemer T et al. Excessive unilateral proliferation of spermatogonia in a patients with non-obstructive azoospermia – adverse effect of clomiphene citrate pre-treatment ? *Basic and Clinical Andrology*. 2020;30(13):66-72.
114. Finkelstein M, Etkovitz N, Breitbart H.  $Ca^{2+}$  signaling in mammalian spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol*. 2020;516:110-119.
115. Flannigan R, Bach R, Schlegel PN. Microdissection testicular sperm extraction. *Transl Androl Urol*. 2017;6(4):745-752.
116. Flynn ERM, Bradley KN, Muir NC et al. Functionally-separate intracellular  $Ca^{2+}$  stores in smooth muscle. *J Biol Chem*. 2001;276(39):36411-36418.
117. Foghi K, Novin MG, Jabbari ZM et al. Immuno-histochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in testicular sells of men with non-obstructive azoospermia. *Iran J Reprod Med*. 2011;9(4):277-280.
118. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthase: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-837.
119. Fu L. Screening and clinical phenotype analysis of microdeletions of azoospermia factor region on Y chromosome in 1011 infertile men // *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2012;29(2):184-187.
120. Fujisawa M, Yamanaka K, Tanaka H et al. Expression of endothelian nitic oxide synthase in the Sertoli cells of men with infertility of various causes. *BJU International*. 2011;87:85-88.

121. Gallego A, Rogel R, Lujan S et al. AZF gene microdeletions: case series and literature review. *Urol Esp.* 2014;38(10):698-702.
122. Gilany K. Polyol pathway shed light on non-obstructive azoospermial testicular sperm extraction (TESE) negative ROS imbalance. *Glob J Reprod Med.* 2018;5(5):1-2.
123. Gilany K, Jafarzadeh N, Mani-Varnosfsderani A, Minai-Nehrani A, Sadeghi M et al. Metabolic fingerprinting of seminal plasma from non-obstructive azoospermia patients: positive versus negative sperm retrieval. *J Reprod Infertil.* 2018;19(2):109-114.
124. Ghalayini I, Al-Ghazo MA, Hani OV et al. Clinical comparison of conventional testicular sperm extraction and microdissection techniques for non-obstructive azoospermia *J Clin Med Res.* 2011;3(3):124-131.
125. Gharagozloo P, Aitken RJ. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod.* 2011;26(7):1628-1640.
126. Ghuman NK, Singh P, Raikar S. Male infertility-evaluation and menegement at a glance. *Fertility Science and Researh.* 2020;7(1):26-36.
127. Grinspon RP, Loreti N, Braslavsky D et al. Spreading the clinical window for diagnosing fetal-onset hypogonadism in boys. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:51-57.
128. Grunewald S, Glander H-J, Paasch U, Kratzsch J. Age-dependent inhibin B concentration in relation to FSH and semen sample qualities: a study in 2448 men. *Reproduction.* 2015;145(3):237-244.
129. Gudeman SR, Townsend B, Fischer K et al. Etiology of azoospermia in a military population. *J Urol.* 2015;193(4):1318–1321.
130. Guler I, Erdem M, Erdem A et al. Impact of testicular histopathology as a predictor of sperm retrieval and pregnancy outcome in patients with nonobstructive azoospermia: correlation with clinical and hormonal factors. *Andrologia.* 2016;48(7):765-773.

131. Hafez M, El Dayem SM, El Mougy F et al. The role of anti-Mullerian and inhibin B hormones in the evaluation of 46, XY disorders of sex development. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2014;27(9-10):891-899.
132. Hamad A-WR, Al-Daghistani HI, Shquirat WD et al. Sodium, Potassium, Calcium and Copper levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Biochem Pharmacol.* 2014;3:4-10.
133. Hamada AJ, Esteves SC, Agarwal A. A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia. *Clinics.* 2013;68(51):39-60.
134. Hao L, Li ZG, He HG et al. Application of percutaneous epididymal sperm aspiration in azoospermia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21:1032-1035.
135. Hessel M, Vries M, D'Hauwers KW et al. Cytological evaluation of spermatogenesis: a novel and simple diagnostic method to assess spermatogenesis in non-obstructive azoospermia using testicular sperm extraction specimens. *Andrology.* 2015;3:481-490.
136. Hosen M, Islam M, Begum F, Kabir Y et al. Oxidative stress induced sperm DNA damage, a possible reason for male infertility. *Iran J Reprod Med.* 2015;13:525–532.
137. Hu C-Y, Lu D-L, Wu T et al. Glutathione-S-transferases M1/T1 gene polymorphisms and male infertility risk in Chinese populations. A meta-analysis. *Medicine.* 2019;98(6):141-156.
138. Huang X, Bai Q, Yan L, Zhang Q et al. Combination of serum inhibin B and follicle-stimulating hormone levels can not improve the diagnostic accuracy on testicular sperm extraction outcomes in Chinese non-obstructive azoospermic men. *J Chinese Medical Journal.* 2012;125:16:2885-2889.
139. Huleyuk N. Complex cytogenetic and molecular-genetic analysis of males with spermatogenesis failure. *Tsitol. Genet.* 2010;44(6):51-56.
140. Hussein A. Evaluation of diagnostic testis biopsy and the repetition of testicular sperm extraction surgeries in infertility patients. *Fertil Steril.* 2013;100:88-93.
141. Ibrahim E, Aballa TC, Roudebush WE et al. Inhibin B is lower and anti-Müllerian hormone is similar in serum of men with spinal cord injuries compared to controls. *Syst Biol Reprod Med.* 2015;61(2):72-77.

142. Jahromi BN, Zeyghami S, Parsanezhad ME et al. Determining an optimal cut-off value for follicle-stimulating hormone to predict microsurgical testicular sperm extraction outcome in patients with non-obstructive azoospermia. *Arch Endocrinol Metab.* 2020;64(2):165-170.
143. Jorgensen N, Liu F, Andersson AM et al. Serum inhibin B infertile men is strongly correlated with low but not high sperm counts: a coordinated study of 1,797 European and US men. *Fertil. Steril.* 2010;94:2128-2134.
144. Jungwirth A, Diemer A, G.R. Dohle GR et al. Guidelines on male infertility. European Association of Urology. 2015. 42 p.
145. Jungwirth A, Diemer T, Dohle G, Giwercman A, Kopa Z, Tournaye H, Rrausz C. The updated EAU guidelines on male infertility. EAU guidelines office, Arnhem, The Netherlands. 2015.
146. Kalsi JS, Shah P, Thum Y. Salvage microdissection testicular sperm extraction; outcome in men with nonobstructive azoospermia with previous failed sperm retrievals. *BJU Int.* 2015;116(3):460-465.
147. Karbel HA, Al-Bdairi AA, Khairullah AR et al. Histopathological evaluation of non-obstructive azoospermic males using testicular aspirate (TESA) biopsy. *Indian J of Forensic Medicine and Toxicology.* 2020;14(4):2993-3000.
148. Kolesnikova LI, Kurashova NA, Bairova TA et al. Role of glutathione-S-transferase family genes in male infertility. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2017;163(5):643-645.
149. Krzyściak W, Papież M, Bak E et al. Sperm antioxidant biomarkers and their correlation with clinical condition and lifestyle with regard to male reproductive potential. *Journal of Clinical Medicine.* 2020;9:1785-1805.
150. Kurkowska W, Bogach A, Janiszewska M. Oxidative Stress is Associated with Reduced Sperm Motility in Normal Semen. *American Journal of Men's Health.* 2020;14(5):1-8.

151. Le J, Lei X, Ren Y et al. Exogenous oestradiol benzoate induces male mice azoospermia through modulation of oxidative stress and testicular metabolic cooperation. *Molecular Medicine Reports*. 2019;16:4955-4963.

---

152. Li H, Chen LP, Yang J et al. Predictive value of FSH, testicular volume, and histopathological findings for the sperm retrieval rate of microdissection TESE in nonobstructive azoospermia: a meta-analysis. *Asian J Androl*. 2018;20(1):30-36.

153. Li Y, Zhou N, Han X et al. Socio-sycho-behavioural factors associated with male semen quality in China: results from 1346 healthy men in Chongqing. *J Fam Plann Reprod Health Care*. 2013;39(2):102-110.

154. Liu XY, Zhang HY, Pang DX et al. AZFa microdeletions: occurrence in Chinese infertile men and novel deletions revealed by semiconductor sequencing. *Urology*. 2017;107:76-81.

155. Mafra FA. Chromosomal and molecular abnormalities in a group of Brazilian infertile men with severe oligozoospermia or non-obstructive azoospermia attending an infertility service. *Int Braz J Urol*. 2011;37(2):244-250.

156. Manzoor SM, Sattar A, Hashim R, Kham FA, Younas M, Dilawar A-AM, Ijaz A. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2012;24(3-4):113-116.

157. Massart A. Genetic causes of spermatogenic failure. *Asian J Androl*. 2012;14(1):40-48.

158. Martins AD, Selvam MKP, Agarwal A et al. Alterations in seminal plasma proteomic profile in men with primary and secondary infertility. *Scientific Reports*. 2020;10:7539.

159. Messerlian C, Maclagan L, Basso O. Infertility and the risk of adverse pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2013;28:125-137.

160. Metrix PX. Evaluation of the azoospermic male: a committee opinion. *Fertil. Steril*. 2018;109(5):777-782.

161. Moazamian R, Polhemus A, Connaughton H, Fraser B et al. Oxidative stress and human spermatozoa: diagnostic and functional significance of aldehydes generated as a result of lipid peroxidation. *Mol Hum Reprod*. 2015;21:502-515.

162. Moradi M, Alemi M, Moradi A et al. Does inhibin-B help us to confidently refuse diagnostic testicular biopsy in azoospermia. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 2012;10(3):243-248.
163. Moubasher AE, Taha EA, Younis A et al. Testicular tissue oxidative stress in azoospermic patients: effect of cryopreservation. *Andrologia*. 2020;52(11):138-143.
164. Mousavi-Nasab FS, Colagar AH. Genetic variants in nitric oxide synthase genes and the risk of male infertility in a Chinese population: a case-control study. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020;27:22434–22440.
165. Muller C, Lee T, Montano M. Improved chemiluminescence assay for measuring antioxidant capacity of seminal plasma. *Methods Mol. Biol*. 2013; 927:363-376.
166. Naher Z, Biswas SK, Mollah FH et al. Role of glutathione in male infertility. *Bangladesh J Med Biochem*. 2011;4(2):20-25.
167. Nagvenkar P, Desai K, Hinduja I, Zaveri K. Chromosomal studies in infertile men with oligozoospermia and non-obstructive azoospermia. *Indian J Med Res*. 2005;122:34-42.
168. Nakayama A, Ide H, Osaka A et al. The Diagnostic Accuracy of Testicular Torsion by Doctors on Duty Using Sonographic Evaluation with Color Doppler. *Am J Mens Health*. 2020;14(5):155-169.
169. N’Guessan M.-F, Coulibaly PA, Kouassi K et al. Lipid peroxidation and total antioxidant capacity in azoospermic semen. 2016;2(1):41-46.
170. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S. *Andrology. Male reproductive health and dysfunction*. 3rd ed. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag. 2010.
171. Novin NG, Abed F, Hosseini M et al. Expression of endothelial nitric oxide synthase in testicular cells of men with obstructive azoospermia; a case-control study *Men’s Health Journal*. 2018;1(1):3-6 .
172. Osaka A, Iwahata T, Kobori Y et al. Testicular volume in non-obstructive azoospermia with a history of bilateral cryptorchidism may predict successful sperm retrieval by testicular sperm extraction. *Reprod Med Biol*. 2020;19(4):372-377.



173. Papp G, Grof J, Molnafr J, Jambor E. Importance of arginine content and arginine activity in fertility. *Andrologia*. 2009;11(1):367-41.
174. Practice committee of the American society for reproductive medicine. Evaluation of the azoospermic male: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2018;109(5):777-782.
175. Qahraman AS, Abdulrahman ZT, Hammood SK et al. Growth of testes plus pathological and biochemical changes in patients with azoospermia syndrome. *American Journal of BioMedicine*. 2019;7(11):324-333.
176. Razavi SM, Sabbaghian M, Jallili M et al. Comprehensive functional enrichment analysis of male infertility. *Scientific Reports*. 2017;7:1-14.
177. Ribas-Maynou J, Yeste M, Salas-Huetos A. The relationship between sperm oxidative stress alterations and IVF/ICSI outcomes: a systematic review from nonhuman mammals. *Biology*. 2020;9(7):178-186.
178. Robin G, Boitrelle F, Leroy X et al. Assessment of azoospermia and histological evaluation of spermatogenesis. *Ann Pathol*. 2010;30(3):182-95.
179. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2012;27:2908-2917.
180. Rogozin DS. Male fertility: review of the publications of October-december 2019. *Urology Herald*. 2020;8(1):69-74.
181. Sabudi NG. Factors influencing sperm retrieval rate by microdissection testicular sperm extraction (mTESE) in non-obstructive azoospermia cases: a literature review. *Bali Med J*. 2020;9(1):356-359.
182. Saeed S, Khan FA, Khan DA et al. Demonstration of the site of obstruction in azoospermia by biochemical abstract markers. *J Pak Med Assoc*. 2004;44(6):47-53.
183. Salama N, Blgozah S. Serum estradiol levels in infertile men with non-obstructive azoospermia. *Nherapeutic Advance in Reproductive Helth*. 2020;28:120-129.
184. Salehi P, Derakhshan-Horeh M, Nadeali Z et al. Factors influencing sperm retrieval following testicular sperm extraction in nonobstructive azoospermia patients. *Clin Exp Reprod Med*. 2017;44(1):22-27.

185. Sato Y, Shinka T, Nozawa S et al.] Y chromosome haplogroup D2a1 is significantly associated with high levels of luteinizing hormone in Japanese men. *Andrology*. 2015;3(3):520-525.
186. Sinha A, Gupta S. Lipid peroxidation and its impact on infertility. *Women's Health and Gynecology*. 2018;4(1):78-82.
187. Shiraishi K, Oka S, Matsuyama H. Testicular testosterone and estradiol concentrations and aromatase expression in men with nonobstructive azoospermia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2021;20(20):1–13.
188. Showell MG, Mackenzie-Proctor R, Brown J et al. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;12:CD007411.
189. Skandhan KP, Mazumdar B, Sumangala B et al. Seminal plasma calcium in normal and infertile patients. 2016;84(1):35-37.
190. Song Y, Jia ZC, Chen JY et al. Toxic effects of atrazine on reproductive system of male rats. *Biomed Environ Sci*. 2014;27:4:281-288.
191. Spahovic H, Alic J, Goktolga U et al. "Second-look" micro testicular sperm extraction (MicroTESE) in patients with non-obstructive azoospermia following histopathological analysis. *Medical Archives*. 2020;74(4):279-284.
192. Stacey K, Friedman A, Ryan B. Infertility: an overview of the causes and treatments. *US Pharm USA: San Diego*. 2012;37:6:39-42.
193. Suganya J, Kujur SB, Selvaraj K, Suruli MS et al. Chromosomal abnormalities in infertile men from Southern India. *J. Clin Diagn Res*. 2015;9(7):5-10.
194. Tharakan T, Luo R, Foran D et al. Strategies in infertile azoospermic patients with negative microdissection testicular sperm extraction surgery. *Turk J Urol*. 2020;23:204-209.
195. Thorup J, Clasen-Linde E et al. Pre-and postoperative status of gonadotropins (FSH and LH) and inhibin-B in relation to testicular histopathology at orchiopexy in infant boys with unilateral undescended testes. *J Pediatr Urol*. 2015;11(1):25-31.
196. Thyagarajan HM, Tiwari KK, Rashid MB. Nitric oxide in male infertility. *The FASEB Journal*. 2012;26(1):11-18.

197. Toulis KA, Iliadou PK, Venetiset CA et al. Inhibin B and anti-Mullerian hormone as markers of persistent spermatogenesis in men with non-obstructive azoospermia: a meta-analysis of diagnostic accuracy studies. *Hum. Reprod. Update.* 2010;16(6):713-724.
198. Trabado S, Lamothe S, Maione L et al. Congenital hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome as models for studying hormonal regulation of human testicular endocrine functions. *Ann Endocrinol (Paris).* 2014;75(2):79-87.
199. Trabado S, Johannsen TH, Ljubicic ML et al. Serum insulin-like factor 3 quantification by LC-MC/MC in male patients with hypogonadotropic hypogonadism and Klinefelter syndrome. *Endocrine.* 2021;101(4):1-6.
200. Trabado S, Maione L, Salenave S et al. Estradiol levels in men with congenital hypogonadotropic hypogonadism and the effects of different modalities of hormonal treatment. *Fertil. Steril.* 2011;95(7):2324-2329.
201. Trabado S, Maione L, Bry-Gauillard H, et al. Insulin-like peptide 3 (INSL3) in men with congenital hypogonadotropic hypogonadism/Kallmann syndrome and effects of different modalities of hormonal treatment: a single-center study of 281 patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(2):E268-275.
202. Tradewell MB, Masterson TA. Non obstructive azoospermia: a spectrum, not a single disease. *Fertil Steril.* 2020;115(2):315-321.
203. Vloeberghs V, Verheyen G, Haentjens P et al. How successful is TESE-ICSI in couples with non-obstructive azoospermia? *Hum Reprod.* 2015;30(8):1790-1796.
204. Vloeberghs V, Verheyen G, Santos-Ribeiro S et al. Is genetic fatherhood within reach for all azoospermic Klinefelter men ? *PLOS One.* 2018;13(7):e0200300.
205. Walczak-Jedrzejowska R, Wolski J, Slowikowska-Hilczer J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Cent European J Urol.* 2013;66:60-67.
206. Wang C, Jackson G, Jones TH et al. Low testosterone associated with obesity and the metabolic syndrome contributes to sexual dysfunction and cardiovascular disease risk in men with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2011;34(7):1669-1675.

207. Westlander G. Utility of micro-TESE in the most severe cases of non-obstructive azoospermia. *Upsala Journal of Medical Sciences*. 2020;125(2):99-103.
208. World Health Organisation. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. ed. 5. Geneva, Switzerland: WHO; 2010
209. Wosnitzer M, Goldstein M. Obstructive azoospermia. *Urol Clin North Am*. 2014;41(1):983-95.
210. Wosnitzer M, Goldstein M, Hardy M. Review of azoospermia. *Spermatogenesis*. 2014;4(1):28-32.
211. Xie D, Klopukh B, Nehrenz GM, Bianco F, Gheiler E. Aspermia: a review of etiology and treatment. *Int Arch Urol Complic*. 2016;3(1):1-9.
212. Xu T, Peng L, Lin X et al. Predictors for successful sperm retrieval of salvage microdissection testicular sperm extraction (TESE) following failed TESE in nonobstructive azoospermia patients. *Andrologia*. 2017;49(4):276-281.
213. Yan L, Guo W, Wu S et al. Genetic variants in nitric oxide synthase genes and the risk of male infertility in a Chinese population: a case-control study. *PLOS One*. 2014;9(12):115-119.
214. Yao C, Yang C, Zhao L et al. Bi-allelic *SHOS1* loss-of-function mutations cause meiotic arrest and non-obstructive azoospermia. *J Med Genet*. 2020;0:1-8.
215. Yin Y, Zhu P, Luo T, Xia X. Association of single-nucleotide polymorphisms in antioxidant genes and their gene-gene interactions with risk of male infertility in a Chinese population. *Biomedical Reports*. 2020;18:49-54.
216. Yu B, Huang Z. Variations in antioxidant genes and male infertility. *BioMed Res Intern*. 2015;2015:115-122.
- 
217. Yukselten Y, Aydos O, Sunguroglu A, Aydos K. Investigation of CD133 and CD24 as candidate azoospermia markers and their relationship with spermatogenesis defects. *Gene*. 2019;706:211-221.
218. Zeadna A, Khateeb N, Rokach L et al. Prediction of sperm extraction in non-obstructive azoospermia patients: a machine-learning perspective. *Hum Reprod*. 2020;35(7):1505-1514.

219. Zini A, O'Bryan MK, Schlegel PN. Nitric oxide synthase activity in human seminal plasma. *Urology*. 2011;58(1):85-89.
220. Zhang M, Liu C, Cui F-P et al. The role of oxidative stress in association between disinfection by-products exposure and semen quality: A mediation analysis among men from an infertility clinic. *Chemosphere*. 2021;268:1-8.
221. Zhang X, Huang R, Zhou Y et al. IP3R Channels in Male Reproduction. *Int J Mol Sci*. 2020;21:9179-9191.
222. Zhao H, Zhang H, Xi Q et al. Case report: A non-obstructive azoospermia patient with heat shock factor-2 mutation. *Medicine*. 2020;99(31):211-217.
223. Zhao LY, Yao CC, Xing XY et al. Single-cell analysis of developing and azoospermia human testicles reveals central role of Sertoli cells. *Nature Communications*. 2020;11:5683-5689.
224. Zhou N, Li Y, Han X et al. Socio-sycho-behavioural factors associated with male semen quality in China: results from 1346 healthy men in chongqing. *J Fam Plann Reprod Health Care*. 2013;39(2):102-110.
225. Zorn B, Golob B, Ihan A et al. Apoptotic sperm biomarkers and their correlation with conventional sperm parameters and male fertility potential. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29(4):357-364.