

Преимущества сперматологического исследования методом количественного кариологического анализа незрелых половых клеток у пациентов с азооспермией и криптозооспермией

М.И. Штаут, Т.М. Сорокина, В.Б. Черных, Л.Ф. Курило

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова»; Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1

Контакты: Любовь Федоровна Курило kurilo@med-gen.ru

Введение. Обнаружение сперматозоидов у пациентов с предполагаемой азооспермией является актуальной задачей при диагностике причин мужского бесплодия и решении проблемы репродукции. Количественный кариологический анализ состава незрелых половых клеток (ККА НПК) по стадиям их развития позволяет неинвазивно оценить состояние сперматогенеза и прохождение различных стадий мейоза, и, таким образом, имеет определенные преимущества по сравнению со стандартным спермиологическим исследованием (ССИ) и тестикулярной биопсией.

Цель исследования – сравнительный анализ возможностей ССИ и ККА НПК по обнаружению половых клеток в эякуляте пациентов с предполагаемой азооспермией.

Материалы и методы. Исследованы образцы эякулята 20 мужчин с первичным бесплодием различного генеза (генетически обусловленные формы мужского бесплодия и неясной этиологии) и подозрением на азооспермию. Образцы анализировали параллельно 2 методами – используя ССИ, выполненное согласно рекомендациям руководства Всемирной организации здравоохранения (2010), и ККА НПК.

Результаты. По данным ССИ, криптозооспермия обнаружена в 1 (5 %) из 20 образцов эякулята. ККА НПК позволил выявить наличие сперматозоидов в 10 (50 %) образцах, в том числе у 53 % пациентов с азооспермией (по данным ССИ). Среднее количество сперматозоидов, обнаруженных в осадке эякулята при ККА НПК, составило $2,25 \pm 4,22$, что статистически значимо больше ($p = 0,019$; $U = 113$) числа сперматозоидов, выявленных с помощью ССИ ($0,25 \pm 1,12$).

Заключение. У пациентов с подозрением на азооспермию эффективность выявления криптозооспермии с помощью метода ККА НПК значительно (в 10 раз) превышает результативность ССИ. Данный метод дополняет ССИ и позволяет неинвазивно выявить нарушение мейоза, в том числе при крайне малой концентрации сперматозоидов. Анализ безопасен для пациента и может быть выполнен многократно для отслеживания динамики сперматологических показателей.

Ключевые слова: мужское бесплодие, азооспермия, криптозооспермия, сперматогенез, сперматозоиды, незрелые половые клетки, эякулят

Для цитирования: Штаут М.И., Сорокина Т.М., Черных В.Б., Курило Л.Ф. Преимущества сперматологического исследования методом количественного кариологического анализа незрелых половых клеток у пациентов с азооспермией и криптозооспермией. Андрология и генитальная хирургия 2022;23(2):19–26. DOI: 10.17650/2070-9781-2022-23-2-19-26.

Advantages of semen analysis by quantitative kariological analysis of immature germ cells in azoospermic and cryptozoospermic patients

M.I. Shtaut, T.M. Sorokina, V.B. Chernykh, L.F. Kurilo

Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorechye St., Moscow 115522, Russia

Contacts: Lubov Fedorovna Kurilo kurilo@med-gen.ru

Introduction. Obtaining spermatozoa in azoospermic men is a relevant objective. Quantitative karyological analysis of immature germ cells (QKA IGCs) allows to characterize the progression of spermatogenesis through different meiotic stages, that present some advantages in comparison with standard semen analysis (SSA) examination and testicular biopsy.

The study objective was to analyze SSA and QKA IGCs for detecting of germ cells in the ejaculate of patients with suspected azoospermia.

Materials and methods. The ejaculate samples of 20 men with suspected azoospermia of various etiology (genetically determined and idiopathic male infertility) were studied. The ejaculate samples were processed in parallel by two methods, SSA performed according to the WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (2010) and QKA IGCs.

Results. Using by the SSA, cryptozoospermia was detected in 1 (5 %) of 20 ejaculate samples. QKA IGCs revealed cryptozoospermia in 10 (50 %) samples, including 53 % of patients (with azoospermia according to SSA). The number of spermatozoa in the ejaculate sediment as a result of QKA IGCs (2.25 ± 4.22) is higher ($p = 0.019$; $U = 113$) than the number of spermatozoa as a result of the SSA – 0.25 ± 1.12 .

Conclusion. In patients with suspected azoospermia, the effectiveness of detecting cryptozoospermia using the QKA IGCs method is significantly (10 times) higher than the SSA. This method complements SSA and makes it possible to detect non-invasively the meiosis defects, including cases with an extremely low concentration of spermatozoa. The analysis is safe for the patient and can be performed repeatedly to track the dynamics of semen parameters.

Keywords: male infertility, azoospermia, cryptozoospermia, spermatogenesis, sperm, immature germ cells, ejaculate

For citation: Shtaut M.I., Sorokina T.M., Chernykh V.B., Kurilo L.F. Advantages of semen analysis by quantitative karyological analysis of immature germ cells in azoospermic and cryptozoospermic patients. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya* = *Andrology and Genital Surgery* 2022;23(2):19–26. (In Russ.). DOI: 10.17650/2070-9781-2022-23-2-19-26.

Введение

Частота бесплодия среди супружеских пар составляет в среднем 15 %, при этом у 5–7 % мужчин репродуктивного возраста из общей популяции отмечают нарушение фертильности [1]. В большинстве случаев нарушение мужской фертильности обусловлено патозооспермией. Наиболее тяжелая форма патозооспермии – азооспермия, которая, в свою очередь, может быть различной формы (необструктивная, обструктивная или смешанная). Азооспермия может быть вызвана генетическими или негенетическими причинами, но зачастую ее причина остается неустановленной (идиопатической). Если после сгущения в осадке эякулята находят единичные сперматозоиды, при отсутствии их во время исследования нативного эякулята, то диагностируют криптозооспермию, которую могут отмечать не во всех исследованных только ССИ образцах [2].

Среди генетических причин необструктивной азооспермии наиболее частыми являются синдром Клайнфельтера, микроделеции в локусе AZF Y-хромосомы, реже отмечают другие аномалии половых хромосом, например мозаицизм по хромосоме Y, мутации различных генов, вовлеченных в контроль сперматогенеза. Обструктивная форма азооспермии обусловлена непроходимостью семявыносящих протоков, реализующейся через другой механизм (который в своей основе может иметь как генетические причины, так и негенетические). Обструктивную форму патозооспермии диагностируют у 95–98 % мужчин, больных муковисцидозом [3–5], и у мужчин с двусторонней аплазией семявы-

носящих протоков – синдромом CBAVD (congenital bilateral absence of vas deferens) [6].

При крайне малой концентрации сперматозоидов в эякуляте обнаружение половых клеток при стандартном спермиологическом исследовании (ССИ) затруднено или невозможно. В отличие от него, количественный кариологический анализ состава незрелых половых клеток (ККА НПК) по стадиям мейоза позволяет охарактеризовать состояние сперматогенеза (при отсутствии полной двусторонней непроходимости семявыносящих путей) посредством оценки состава мужских половых клеток в эякуляте, с помощью анализа мейотического режима и патологии мейоза мужских половых клеток [7–9]. Кроме того, возможность идентифицировать половые клетки (по стадиям их развития), эпителиальные, лейкоциты с помощью данного метода позволяет установить, на какой стадии деления или дифференцировки половых клеток произошло нарушение сперматогенеза, и диагностировать различные его дефекты. Для правильной диагностики состояний, приводящих к нарушению сперматогенеза и мужскому бесплодию, важно оценивать состояние гаметогенеза, количество и качество половых клеток на разных стадиях дифференцировки. Данная диагностика имеет существенное значение для оценки возможности получения сперматозоидов у мужчин с азооспермией или с предполагаемой азооспермией, что является особенно актуальной задачей.

Цель исследования – сравнительный анализ возможностей ССИ и ККА НПК для оценки сперматогенеза и обнаружения незрелых половых клеток (НПК)



и сперматозоидов в эякуляте пациентов с предполагаемой азооспермией.

Материалы и методы

Обследованная выборка пациентов состояла из 20 неродственных мужчин репродуктивного возраста с азооспермией или подозрением на азооспермию, обратившихся в лабораторию генетики нарушений репродукции ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова» в связи с первичным бесплодием в браке. В исследуемую группу вошли 5 пациентов с муковисцидозом, 1 пациент с синдромом CBAVD (генотип по гену *CFTR* — F508del/N, 9T/5T), 3 пациента с синдромом Клайнфельтера (кариотип 47,XXY), 2 пациента с мозаицизмом по Y-хромосоме (кариотипы: mos 46,X,der(Y)[34]/45,X[11], mos 46,X,der(Y)[16]/45,X[14]), 2 пациента с делециями в локусе AZF Y-хромосомы (del AZFb+c; del AZFb), 7 пациентов с первичным бесплодием неясной этиологии.

Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова». Все пациенты дали письменное добровольное информированное согласие на проведение данного исследования.

От каждого пациента получено по одному образцу эякулята, всего исследовано 20 образцов. Все исследованные образцы эякулята удовлетворяли условиям отсутствия сперматозоидов в двух влажных препаратах. Каждый образец обрабатывали параллельно двумя методами. ССИ выполняли согласно руководству Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [2]. В соответствии с рекомендациями данного лабораторного руководства, если в двух влажных препаратах не обнаружено ни одного сперматозоида, то аликвоту образца (объемом 1 мл) центрифугируют при 3000 g в течение 15 мин. При этом для оценки образца рекомендуется проанализировать 484 поля зрения под покровным стеклом.

Количественный кариологический анализ состава незрелых половых клеток из эякулята на разных стадиях сперматогенеза выполняли согласно авторской методике («Способ цитологической диагностики нарушения сперматогенеза», патент проф. Л.Ф. Курило на изобретение № 2328736 от 01.02.2007 г.) [9]. Для приготовления препарата эякулят выдерживали в гипотоническом растворе KCl, центрифугировали, после чего осадок 3 раза фиксировали в смеси метанол/ледяная уксусная кислота. Подсчет ядер и идентификацию клеток осуществляли на суховоздушных препаратах осадка эякулята, окрашенных раствором Гимзы. Суммировали число ядер НПК на разных стадиях, вычисляя долю (%) ядер половых клеток на каждой стадии от общего количества подсчитанных НПК. На 500–1000 полей зрения препаратов морфологически идентифицировали ядра НПК на следующих стадиях сперматогенеза: сперматоциты на стадиях предпахи-

теного развития (прелептотены, лептотены и зиготены профазы I мейоза), пахитены, диплотены профазы I, метафазы I и II мейоза, ана- и телофазы I и II мейоза, две объединенные стадии сперматогенеза (сперматоциты II + сперматиды, так как стадия сперматоцитов II относится к непродолжительной профазе II мейоза). Также в общую сумму подсчитанных ядер НПК включены неидентифицируемые ядра НПК. Параллельно выявляли ядра соматических клеток (эпителиальных клеток, лейкоцитов). Индекс НПК не рассчитывали в случаях недостаточного количества сперматозоидов. Образцы с предполагаемой азооспермией (для всех пациентов обследованной выборки) не позволяют считать данный показатель. При достаточной концентрации сперматозоидов индекс НПК рассчитывается как отношение всех НПК к сумме всех половых клеток (зрелых и незрелых), обнаруженных при подсчете 1000 сперматозоидов.

Один из характерных признаков нарушений сперматогенеза — образование двухъядерных сперматоцитов II и двухъядерных и четырехъядерных сперматид. При наличии таких атипичных форм НПК вычисляли долю (%) двух-/четырехъядерных НПК от суммы клеток — сперматоцитов II и сперматид. Доля сперматоцитов II и сперматид с неразшедшими ядрами от всех НПК, проанализированных в образце, является отдельным показателем ККА НПК, который не входит в сумму 100 % разных стадий сперматогенеза [9].

Нормативные показатели ККА НПК (условный контроль) взяты из исследования показателей эякулята мужчин контрольной группы — доноров спермы [10].

Стандартное спермиологическое исследование и ККА НПК выполняли с использованием светового микроскопа ECLIPSE E200 Nikon (Япония) при увеличении $\times 1000$.

Статистический анализ данных проводили с использованием программы StatSoft STATISTICA, версия 8 (Dell Technologies, США). Сравнительный анализ результатов ССИ и ККА НПК выполняли, применяя *U*-критерий Манна–Уитни, статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

При проведении ССИ криптозооспермия обнаружена в 1 (5 %) из 20 образцов (табл. 1). Выполнение ККА НПК позволило обнаружить криптозооспермию в 10 (50 %) из 20 образцов. ККА НПК позволил выявить криптозооспермию в 10 из 19 образцов, т. е. уточнить диагноз у 53 % пациентов (после анализа полученных при проведении ССИ данных).

При ССИ в осадке исследованных образцов эякулята обнаружено от 0 до 5 сперматозоидов (см. табл. 1). При ККА НПК в осадке эякулята обнаружены от 0 до 18 сперматозоидов и от 0 до 239 НПК. Среднее количество сперматозоидов, найденных с помощью



Таблица 1. Данные стандартного спермиологического исследования (ССИ) и количественного кариологического анализа состава незрелых половых клеток (ККА НПК) из эякулята пациентов с предполагаемой азооспермией

Table 1. Data of standard semen analysis (SSA) and quantitative karyological analysis of immature germ cells (QKA IGCs) of ejaculate of patients with suspicion of azoospermia

Код образца Sample code	Клинический диагноз/ генетическое нарушение Clinical diagnosis/ genetic abnormality	Данные ССИ SSA data			Данные ККА НПК QKA IGC data	
		Объем эякулята, мл Ejaculate volume, ml	pH	Количество обнаруженных сперматозоидов Detected number of sperm	Количество обнаруженных НПК Detected number of IGCs	Количество обнаруженных сперматозоидов Detected number of sperm
70100	Синдром Клайнфельтера Klinefelter syndrome	3,4	7,7	0	7	2
70292	Синдром Клайнфельтера Klinefelter syndrome	2,0	7,7	0	239	3
70981	Синдром Клайнфельтера Klinefelter syndrome	3,0	7,7	0	50	2
70703	Мозаицизм X/XY X/XY mosaicism	4,0	7,6	0	0	0
72497	Мозаицизм X/XY X/XY mosaicism	4,0	7,7	0	50	4
70676	Делеция AZFb AZFb deletion	4,0	7,3	0	0	0
70813	Делеция AZFb+c AZFb+c deletion	4,0	8,0	0	80	2
70326	Муковисцидоз Cystic Fibrosis	1,6	6,2	0	60	3
70490	Муковисцидоз Cystic Fibrosis	0,5	6,2	0	2	2
70589	Муковисцидоз Cystic Fibrosis	1,6	6,2	0	0	1
70651	Муковисцидоз Cystic Fibrosis	0,5	6,5	0	0	0
72395	Муковисцидоз Cystic Fibrosis	0,6	6,0	0	0	0
71865	Синдром CBAVD CBAVD syndrome	0,5	6,3	0	0	0
69160	Мужское бесплодие Male infertility	4,0	7,5	0	0	0
69215	Мужское бесплодие Male infertility	4,0	7,4	0	0	0
70425	Мужское бесплодие Male infertility	6,0	7,7	5 (неподвижных сперматозоидов) 5 (immotile sperm)	21	8
70645	Мужское бесплодие Male infertility	1,0	7,6	0	0	0
70657	Мужское бесплодие Male infertility	0,9	6,5	0	0	0
72522	Мужское бесплодие Male infertility	1,7	6,0	0	6	0
72598	Мужское бесплодие Male infertility	4,0	7,4	0	67	18

Примечание. Здесь и в табл. 2: НПК – незрелые половые клетки.
Note. Here and in table 2: IGCs – immature germ cells.

Таблица 2. Количественный кариологический анализ состава незрелых половых клеток (ККА НПК) из осадка эякулята
Table 2. Quantitative karyological analysis of immature germ cells (QKA IGCs) from ejaculate sediment

Показатель ККА НПК QKA IGCs parameter	Индекс НПК, % IGCs index, %	НПК на разных стадиях развития IGCs at different developmental stages					Неидентифици- рованные поло- вые клетки, % Unidentified germ cells, %	Незрелые НПК (спер- матиды) II и сперматиды), % Non-disjuncted IGCs nuclei (spermatocytes II and spermatids), %
		Профаза I мейоза Meiosis prophase I				Сперматиды II и сперматиды, % Spermatocytes II and spermatids, %		
		Прелетотена- зиготена, % Preleptotene- zygotene, %	Пахитена, % Pachytene, %	Диплотена, % Diplotene, %	Диакинез (MI, MII), % Diakinesis, (MI, MII), %			
Значения в иссле- дованной выборке пациентов* Values in the studied patient sample*	Не рассчитывали Not calculated	0,05 ± 0,15	0,41 ± 0,80	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	93,45 ± 5,78	5,91 ± 5,58	5,91 ± 5,89
Референсные значения** Reference values**	2—4	0,66 ± 0,16	0,45 ± 0,10	1,11 ± 0,26	0,04 ± 0,02	91,99 ± 0,89	5,85 ± 0,85	22,98 ± 2,65

* Пациенты, у которых в осадке эякулята обнаружены половые клетки; ** в качестве нормативных значений использовались данные из сообщения Л.Ф. Курило и соавт., 1995 г. [10].
* Patients with cells in the ejaculate sediment; ** normal values were taken from L.F. Kurilo et al., 1995 [10].

данного метода, составило $2,25 \pm 4,22$, что статистически значимо больше ($U = 113$; $p = 0,019$) количества сперматозоидов, найденных в осадке эякулята при проведении ССИ ($0,25 \pm 1,12$). Методика ССИ не позволяет оценивать количество и стадии НПК (табл. 2) в семенной жидкости, поэтому количество НПК не оценивалось при сравнении методов.

У всех 3 пациентов с синдромом Клайнфельтера с помощью ССИ сперматозоиды не обнаружены, а при ККА НПК выявлены НПК в количестве от 7 до 239 и единичные сперматозоиды (2–3).

У 1 пациента с мозаицизмом по Y-хромосоме (кариотип $\text{mos } 46, X, \text{der}(Y)[34]/45, X[11]$) не найдено сперматозоидов и НПК ни при проведении ККА НПК, ни при ССИ. У другого пациента с мозаицизмом по Y-хромосоме (кариотип $\text{mos } 46, X, \text{der}(Y)[16]/45, X[14]$) обнаружены 50 НПК и 4 сперматозоида при ККА НПК (при отсутствии по данным ССИ), что в данном случае указывает на частично сохранный сперматогенез.

У пациента с делецией региона AZFb Y-хромосомы не найдено сперматозоидов и НПК. У пациента с делецией AZFb+c обнаружены 80 НПК и 2 сперматозоида при ККА НПК (при отсутствии по данным ССИ).

У 3 из 5 пациентов с муковисцидозом обнаружены единичные сперматозоиды (2–3) при ККА НПК (при отсутствии по данным ССИ). У 1 пациента с синдромом CBAVD не найдено сперматозоидов и НПК при ССИ и ККА НПК. Для данных образцов рН эякулята и объем меньше нормы (кроме 1 пациента с муковисцидозом) отражали характеристики обструктивной патозооспермии.

У 5 из 7 мужчин с первичным бесплодием неясной этиологии не обнаружены сперматозоиды, у 2 мужчин выявлена криптозооспермия. У одного из них (код пациента 70425) при ССИ после центрифугирования и исследования осадка эякулята (согласно руководству ВОЗ [2]) найдено 5 неподвижных живых сперматозоидов (см. табл. 1).

После комплексного спермиологического исследования, проведенного параллельно 2 методами (ССИ + ККА НПК), азооспермия диагностирована у 10 (50 %) из 20 пациентов с подозрением на азооспермию, то есть сперматологический диагноз для них после всех этапов ССИ и/или ККА НПК уточнен до криптозооспермии.

Обсуждение

Криптозооспермия – сперматологический диагноз, который ставят на основании обнаружения в осадке эякулята единичных сперматозоидов при отсутствии их во влажных препаратах при проведении ССИ (рекомендация руководства ВОЗ (2010) [2]). В случае отсутствия сперматозоидов в двух влажных препаратах принципы их дальнейшего поиска согласно рекомендациям ВОЗ и при выполнении ККА НПК в чем-то сходны,

поскольку и в том и в другом случае исследуется осадок эякулята после центрифугирования.

Согласно рекомендациям 5-го издания Руководства ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека (2010), оценка осадка проводится из аликвоты образца (объемом 1 мл) [2]. При объеме эякулята меньше нормативных значений (при обструктивной патозооспермии) использовали весь объем, поделенный для 2 этапов. Для анализа методом ККА НПК используется весь осадок, что целесообразнее в случаях с объемом эякулята заметно больше 1 мл. Процедура подготовки пробы для выявления криптозооспермии при помощи методов ССИ и ККА НПК имеет некоторые отличия. В частности, по протоколу ККА НПК необходимо трехкратное центрифугирование образцов для четкой фиксации морфологических особенностей ядер НПК. При использовании авторского метода ККА НПК применяем особый способ обработки ядер клеток (на стадиях развития мужских половых клеток, лейкоцитов, эпителия), раскпывания после центрифугирования, окраски раствором Гимзы и подсчета. Метод разработан проф. Л.Ф. Курило и запатентован [7, 9]. Особенности приготовления препаратов для ККА НПК позволяют просмотреть большее число полей зрения. Кроме того, методика приготовления препарата для ККА НПК позволяет достичь лучшего раскпывания клеток, сперматозоиды при окрашивании отмечены более четким контуром, чем после обычного центрифугирования. Помимо этого, разбавление эякулята фиксатором и метод раскпывания позволяют лучше визуализировать раскпанные окрашенные клетки на стекле, в то время как при простом центрифугировании и анализе неразбавленного осадка эякулята исследователи часто сталкиваются с трудностями визуализации клеток из-за наличия дополнительных включений. В связи с особенностями методики приготовления препарата ККА НПК имеет ряд преимуществ [11]. С помощью данного метода возможно выявлять не только сперматозоиды (в том числе единичные), но и установить состав НПК (определить, на каких стадиях находятся НПК) (см. табл. 2) [12]. ККА НПК позволяет оценивать процесс сперматогенеза и его нарушения на различных стадиях дифференцировки гамет без проведения биопсии яичка.

Центрифугирование эякулята согласно руководству ВОЗ [2] позволяет дифференцировать сперматозоиды на живые и мертвые, если они оказались в осадке. Среди 10 пациентов, у которых диагностирована криптозооспермия, у 8 пациентов количество обнаруженных сперматозоидов составило от 1 до 4, у 2 пациентов — 13 и 18, при этом у 1 из них (код 70425) сперматозоиды были выявлены и при ССИ. У данного пациента методом ССИ в осадке эякулята с помощью окрашивания эозином обнаружено 5 неподвижных живых сперматозоидов, а при ККА НПК — еще 8 сперматозоидов и 21 НПК.

Однако следует отметить, что метод ККА НПК не позволяет оценить, живые или мертвые половые клетки присутствовали в эякуляте, так как все клетки, в том числе сперматозоиды, прошли гипотоническую обработку и фиксацию. Таким образом, 2 метода обработки лучше проводить совместно (если позволяет объем эякулята).

Стоит отметить, что ранее с помощью ККА НПК у некоторых пациентов с необструктивной азооспермией различного генеза, в том числе при генетически обусловленных формах мужского бесплодия (синдром Клайнфельтера, микроделеции в локусе AZF), нами были обнаружены единичные сперматозоиды, что позволило уточнить диагноз до криптозооспермии [13–15].

В ходе диагностики и выбора тактики лечения ККА НПК может быть использован в качестве дополнительного метода для контроля эффективности лечения.

Проведение биопсии с целью получения сперматозоидов у пациентов с необструктивной формой азооспермии, у которых несколько анализов методом ККА НПК не выявили наличие сперматозоидов, будет нецелесообразным. Кроме того, важно соотносить данные с генотипом пациента для необструктивной формы азооспермии. Так, при наличии 46,XX-тестикулярной формы нарушения формирования пола (кариотип 46,XX у мужчин), тяжелых типов микроделеций Y-хромосомы (делеции с утратой всего региона AZFa или AZFb) получить сперматозоиды, пригодные для программ экстракорпорального оплодотворения, не представляется возможным из-за тяжелого нарушения сперматогенеза. Поэтому при выявлении данных генетических нарушений даже при обнаружении единичных сперматозоидов в эякуляте рекомендуется не выполнять биопсию с целью получения сперматозоидов для экстракорпорального оплодотворения или интрацитоплазматических инъекций сперматозоидов [7, 11].

У пациентов с азооспермией (по данным ССИ) неоднократное обнаружение в осадке эякулята по результатам ККА НПК сперматозоидов и НПК разных стадий развития (см. табл. 2) свидетельствует о наличии частично сохраненного сперматогенеза. Причем признаки сохранения сперматогенеза с помощью ККА НПК обнаруживают более точно, чем при биопсии, так как патологический процесс может нарушать функцию сперматогенеза неравномерно по объему яичка, и при проведении биопсии используется небольшая часть всего объема извитых семенных канальцев, в которых могут находиться половые клетки [8], в некоторых случаях степень поражения различна в обоих яичках [16–18]. Точное число сперматозоидов, которое должно быть найдено для рекомендации к проведению биопсии, требует дальнейших исследований.

Проводить ККА НПК следует после ССИ при условии достаточного объема эякулята. В таком случае можно оценить сперматозоиды на жизнеспособность. То есть эти два метода дополняют друг друга при

обследовании пациентов с азооспермией и олигоспермией тяжелой степени. Если объема эякулята недостаточно, мы рекомендуем использовать ККА НПК как более информативный метод для выявления криптозооспермии. При необструктивной азооспермии мы рекомендуем проводить ККА НПК до биопсии яичек.

С учетом сложности получения и анализа материала с помощью биопсии, а также относительной легкости и достаточной точности ККА НПК данный метод может наглядно и достаточно точно характеризовать морфофункциональное состояние мужских половых желез [8]. Анализ незрелых половых клеток из осадка эякулята безопасен для пациента и может быть

выполнен многократно для оценки сперматологических показателей в динамике.

Заключение

У пациентов с подозрением на азооспермию эффективность выявления криптозооспермии с помощью метода ККА НПК значительно (в 10 раз) превышает соответствующую эффективность ССИ. Данный метод дополняет ССИ и позволяет неинвазивно оценить состояние сперматогенеза по соотношению половых клеток на разных стадиях развития, выявить нарушение мейоза, в том числе при крайне малой концентрации сперматозоидов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Skakkebaek N.E., Rajpert-De Meyts E., Buck Louis G.M. et al. Male reproductive disorders and fertility trends: influences of environment and genetic susceptibility. *Physiol Rev* 2016;96(1):55–97. DOI: 10.1152/physrev.00017.2015. PMID: 26582516.
- Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. Пер. с англ. Н.П. Макарова. Науч. ред. Л.Ф. Курило. 5-е изд. М.: Капитал Принт, 2012. 291 с. [WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. Transl. from English by N.P. Makarov. Scientific ed. by L.F. Kurilo. 5th edn. Moscow: Kapital Print, 2012. 291 p. (In Russ.)].
- Taussig L.M., Lobeck C.C., di Sant'Agnese P.A. et al. Fertility in males with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1972;287(12):586–9. DOI: 10.1056/NEJM197209212871204.
- Штаут М.И., Шилейко Л.В., Репина С.А. и др. Комплексное сперматологическое обследование пациентов с муковисцидозом. *Андрология и генитальная хирургия* 2017;18(4):69–76. [Shtaut M.I., Schileiko L.V., Repina S.A. et al. Comprehensive semen examination in patients with cystic fibrosis. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2017;18(4):69–76. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2070-9781-2017.
- Штаут М.И., Сорокина Т.М., Курило Л.Ф. и др. Сравнительный анализ результатов спермиологического исследования у пациентов с азооспермией, вызванной муковисцидозом и синдромом врожденной двусторонней аплазии семявыносящих протоков. *Андрология и генитальная хирургия* 2019;20(1):82–90. [Shtaut M.I., Sorokina T.M., Kurilo L.F. et al. Comparative analysis of the results
- semen examination in patients with azoospermia caused by cystic fibrosis and congenital bilateral aplasia of vas deferens syndrome. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2019;20(1):82–90. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2070-9781-2019-20-1-82-90.
- Черных В.Б., Степанова А.А., Бескоровайная Т.С. и др. Частота и спектр мутаций и IVS8-Т-полиморфизма гена *CFTR* среди российских мужчин с бесплодием. *Генетика* 2010;46(6):844–52. [Chernykh V.B., Stepanova A.A., Beskorovainaya T.S. et al. The frequency and spectrum of mutations and the IVS8-T polymorphism of the *CFTR* gene in Russian infertile men. *Genetika = Russian Journal of Genetics* 2010;46(6):844–52. (In Russ.)].
- Андреева М.В., Хаят С.Ш., Шилейко Л.В. и др. Количественный кариологический анализ незрелых половых клеток из эякулята как часть протокола обследования мужчин с бесплодием в браке. *Андрология и генитальная хирургия* 2017;18(1):62–9. [Andreeva M.V., Khayat S.Sh., Shileyko L.V. et al. Quantitative karyological analysis of immature germ cells from ejaculate as part of the protocol of examination of men with infertility in marriage. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2017;18(1):62–9. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2070-9781-2017-18-1-62-69.
- Курило Л.Ф., Чеботарев А.Н., Шилейко Л.В. и др. Сравнительный анализ соотношения незрелых половых клеток на разных стадиях их дифференцировки в биоптате яичка и эякуляте у пациентов с азоо- и олигозооспермией. *Проблемы репродукции* 1997;3(1):80–4. [Kurilo L.F., Chebotarev A.N., Shileyko L.V. et al. Comparative analysis of the ratio of immature germ cells
- at various stages of their differentiation in testicular biopsy material and ejaculate in patients with azoo- and oligozoospermia. *Problemy reproduksii = Russian Journal of Human Reproduction* 1997;3(1):80–4. (In Russ.)].
- Курило Л.Ф. Способ цитологической диагностики нарушения сперматогенеза. Патент на изобретение № 2328736 от 01.02.2007. [Kurilo L.F. Method of cytological diagnosis of spermatogenesis disorders. Patent for invention No. 2328736 dated 01.02.2007 (In Russ.)].
- Курило Л.Ф., Дубинская В.П., Остроумова Т.В. и др. Оценка сперматогенеза по незрелым половым клеткам эякулята. *Проблемы репродукции* 1995;3:33–8. [Kurilo L.F., Dubinskaya V.P., Ostroumova T.V. et al. Evaluation of spermatogenesis by immature ejaculate germ cells. *Problemy reproduksii = Russian Journal of Human Reproduction* 1995;3:33–8. (In Russ.)].
- Сорокина Т.М., Андреева М.В., Штаут М.И. и др. Оценка состояния сперматогенеза у пациентов с азооспермией или криптозооспермией с помощью метода количественного кариологического анализа незрелых половых клеток. *Андрология и генитальная хирургия* 2019;20(1):75–81. [Sorokina T.M., Andreeva M., Shtaut M.I. et al. Quantitative karyological analysis of immature germ cells for the evaluation of spermatogenesis in patients with azoospermia or cryptozoospermia. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2019;20(1):75–81. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2070-9781-2019-20-1-75-81.
- Курило Л.Ф., Шилейко Л.В., Остроумова Т.В. и др. Возможности цитологической количественной оценки состояния сперматогенеза по незрелым

- половым клеткам из эякулята пациентов с проблемами деторождения. Бизнес медицина 1998;3:12–3. [Kurilo L.F., Shileiko L.V., Ostroumova T.V. et al. Possibilities of cytological quantitative assessment of the state of spermatogenesis by immature germ cells from the ejaculate of patients with infertility problems. *Business Meditsina = Business Medicine* 1998;3:12–3. (In Russ.)].
13. Штаут М.И., Сорокина Т.М., Курило Л.Ф., Черных В.Б. Сперматологическая характеристика мозаичной и немозаичной формы синдрома Клайн-фелтера. *Андрология и генитальная хирургия* 2019;20(4):12–6. [Shtaut M.I., Sorokina T.M., Kurilo L.F., Chernykh V.B. Spermatological characteristics of mosaic and non-mosaic forms of Klinefelter syndrome. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2019;20(4):12–6. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2070-9781-2019-20-4-12-16.
 14. Черных В.Б., Курило Л.Ф., Шилейко Л.В. и др. Анализ микро-делений в локусе AZF у мужчин с бесплодием: совместный опыт исследований. *Медицинская генетика* 2003;2(8):367–79. [Chernykh V.B., Kurilo L.F., Shileiko L.V. et al. Analysis of microdeletions in the AZF locus in men with infertility: collaborative experience of research. *Meditsinskaya genetika = Medical genetics* 2003;2(8):367–79. (In Russ.)].
 15. Сафина Н.Ю., Яманди Т.А., Черных В.Б. и др. Генетические факторы мужского бесплодия, их сочетания и спермиологическая характеристика мужчин с нарушением фертильности. *Андрология и генитальная хирургия* 2018;19(2):40–51. [Safina N.Yu., Yamandi T.A., Chernykh V.B. et al. Genetic factors of male infertility, their combinations and semen characteristics of men with fertility disorders. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2018;19(2):40–51. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2070-9781-2018-19-2-40-51.
 16. Райцина С.С. Сперматогенез и структурные основы его регуляции. М.: Наука, 1985. 207 с. [Raytsina S.S. *Spermatogenesis and structural basics of its regulation*. Moscow: Nauka, 1985. 207 p. (In Russ.)].
 17. Ухов Ю.И., Астраханцев А.Ф. Морфометрические методы в оценке функционального состояния семенников. *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии* 1983;(3):66–72. [Ukhov Yu.I., Astrakhansev A.E. Morphometric methods in the evaluation of the functional status of testis. *Arkhir anatomii, gistologii i embriologii = Archive of Anatomy, Histology and Embryology* 1983;(3):66–72. (In Russ.)].
 18. Астраханцев А.Ф. Структура мужских половых желез в постнатальном онтогенезе. Автореф. дис. ... докт. мед. наук. Рязань, 1996. 48 с. [Astrakhansev A.F. *The structure of male sex glands in postnatal ontogenesis*. Abstract for dissertation for the degree of doctor of medical sciences. Ryazan, 1996. 48 p. (In Russ.)].

Вклад авторов

М.И. Штаут: получение данных для анализа, написание текста рукописи;
Т.М. Сорокина: клиническое обследование пациентов;
В.Б. Черных: клиническое обследование пациентов, анализ данных, научное редактирование текста рукописи;
Л.Ф. Курило: разработка методов спермиологического исследования и дизайна исследования.

Authors' contributions

M.I. Shtaut: obtaining data for analysis, manuscript writing;
T.M. Sorokina: clinical examination of patients;
V.B. Chernykh: clinical examination of patients, analysis of obtained data, manuscript editing;
L.F. Kurilo: developing of methods and design of the study.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.И. Штаут / M.I. Shtaut: <https://orcid.org/0000-0002-0580-5575>
Т.М. Сорокина / T.M. Sorokina: <https://orcid.org/0000-0002-4618-2466>
В.Б. Черных / V.B. Chernykh: <https://orcid.org/0000-0002-7615-8512>
Л.Ф. Курило / L.F. Kurilo: <https://orcid.org/0000-0003-3603-4838>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.
Financing. The study was performed within the framework of the state task of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

Соблюдение прав пациентов. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights. All patients gave written informed consent to participate in the study.