

Оценка состояния сперматогенеза у пациентов с азооспермией или криптозооспермией с помощью метода количественного кариологического анализа незрелых половых клеток

Т.М. Сорокина¹, М.В. Андреева¹, М.И. Штаут¹, В.Б. Черных^{1,2}, Л.Ф. Курило¹

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; Россия, 115 522 Москва, ул. Москворечье, 1;

²ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»
Минздрава России; Россия, 117437 Москва, ул. Островитянова, 1

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

Цель исследования – оценить состояние сперматогенеза у пациентов с азооспермией/криптозооспермией с нормальным и сниженным объемом эякулята с помощью метода количественного кариологического анализа незрелых половых клеток из эякулята (ККА НПК).

Материалы и методы. Исследовали 72 образца эякулята пациентов с подозрением на азооспермию, из них 48 имели нормальный объем ($\geq 1,5$ мл) и 24 – сниженный ($< 1,5$ мл). Выполнено стандартное спермиологическое исследование и ККА НПК всех образцов эякулята.

Результаты. В 71 (98,6 %) из 72 исследованных образцов эякулята с помощью ККА НПК обнаружены сперматозоиды. В 16 (33 %) образцах эякулята с нормальным объемом выявлены признаки частичного блока сперматогенеза на допахитенных стадиях, в 8 случаях сочетавшегося с блоком на стадии пахитены, а в 3 случаях – еще и на стадии диплотены. При сниженном объеме эякулята в 6 (25 %) образцах выявлены признаки частичного блока сперматогенеза на допахитенных стадиях, при этом в 1 случае сочетавшегося с блоком на стадии диплотены профазы I мейоза.

Заключение. Неинвазивность, относительная быстрота выполнения и возможность многократного повторения исследования без риска для здоровья пациента позволяют рекомендовать метод ККА НПК для оценки состояния сперматогенеза, в том числе в динамике. При подозрении на азооспермию выполнение ККА НПК является альтернативой диагностической биопсии яичка.

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

Для цитирования: 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.

DOI: 10.17650/2070-9781-2019-20-1-75-81

Quantitative karyological analysis of immature germ cells for the evaluation of spermatogenesis in patients with azoospermia or cryptozoospermia

T.M. Sorokina¹, M.V. Andreeva¹, M.I. Shtaut¹, V.B. Chernykh^{1,2}, L.F. Kurilo¹

¹Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorech'e St., Moscow 115 522, Russia;

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117437, Russia

The study objective is to evaluate spermatogenesis using the method of quantitative karyological analysis of immature germ cells from the ejaculate sediment (QKA IGC) in patients with azoospermia or cryptozoospermia with normal and low semen volume.

Materials and methods. Seventy-two (72) semen samples from patients with suspected azoospermia were analyzed, 48 with normal semen volume ($\geq 1,5$ ml) and 24 with low semen volume ($< 1,5$ ml). A standard semen examination and QKA IGC were performed for all the samples.

Results. By QKA IGC in 98.6 % of the samples spermatozoa were detected. In 16 (33 %) samples with normal ejaculate volume, incomplete spermatogenesis arrest at the pre-pachytene stages was revealed. It was accompanied by pachytene arrest (8 cases) and by diplotene arrest (3 cases). In samples with low ejaculate volume, 6 samples (25 %) showed signs of incomplete spermatogenesis arrest at the pre-pachytene stages; in 1 case it was accompanied by the meiotic arrest at diplotene of prophase I.

Conclusion. Noninvasiveness, relative rapidity and possibility of multiple repeats of the test without risks for the patients' health allow us to recommend QKA IGC for evaluation of spermatogenesis including dynamic evaluation. For suspected azoospermia, we recommend QKA IGC as an alternative for testis diagnostic biopsy.

Key words: azoospermia, cryptozoospermia, meiosis, male infertility, germ cells, spermatogenesis, ejaculate

For citation: Sorokina T. M., Andreeva M. V., 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.

Введение

Азооспермия – наиболее тяжелая форма патозооспермии, которая характеризуется отсутствием сперматозоидов в эякуляте. В зависимости от причины возникновения выделяют 3 формы азооспермии: необструктивную (секреторную), обструктивную и азооспермию смешанного генеза.

При секреторной форме азооспермии наблюдается недостаточность сперматогенеза, вызванная полной или неполной остановкой созревания половых клеток, вплоть до полного угнетения сперматогенеза и аплазии сперматогенного эпителия, т. е. нарушен процесс образования сперматозоидов. Причиной этого могут быть как генетические нарушения (численные и структурные мутации половых хромосом (синдром Клайнфельтера, микроделеции Y-хромосомы и др.), мутации генов, регулирующих сперматогенез), так и средовые факторы [1–3]. Среди форм необструктивной азооспермии выделяют транзиторную азооспермию (временное отсутствие половых клеток в эякуляте), которая может возникать на непродолжительное время в результате воздействия повреждающих факторов, заболеваний, приема некоторых препаратов и др. [4].

При обструктивной азооспермии сперматогенез, как правило, протекает нормально, но сперматозоиды не попадают в эякулят вследствие отсутствия семявыносящих протоков или непроходимости семявыносящих путей. Проподимость может быть нарушена на уровне придатков яичек, а также семявыносящих и семяизвергающих протоков [5]. К генетическим причинам обструкции относят аплазию семявыносящих протоков, вызванную муковисцидозом или синдромом их врожденного двустороннего отсутствия (congenital bilateral absence of the *vas deferens*, CBAVD). Нарушение проходимости семявыносящих путей может быть также вызвано острым или хроническим эпидидимитом, воспалительными изменениями семенных пузырьков и предстательной железы [6]. Обструктивная форма диагностируется приблизительно у 40 % мужчин с азооспермией [7].

В некоторых случаях наблюдается сочетание нарушения сперматогенеза различной степени в одном или обоих яичках и полного или неполного нарушения проходимости семявыносящих путей с одной или обеих сторон.

Первичный метод диагностики азооспермии – стандартное спермиологическое исследование. Согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения, для оценки показателей эякулята проводят не менее 2 анализов, выполненных с интервалом в 2–3 нед.

Если сперматозоиды отсутствуют в нативном препарате, но присутствуют в осадке эякулята, диагностируют криптозооспермию [8].

Ранее биопсию яичка считали необходимой диагностической процедурой при азооспермии, но в настоящее время подавляющее большинство специалистов выступают против выполнения биопсии с диагностической целью и рекомендуют разрабатывать и использовать неинвазивные методы [6]. Так, Л.Ф. Курило и соавт. (1997) провели количественный кариологический анализ незрелых половых клеток (ККА НПК) у пациентов с азооспермией и олигозооспермией и установили, что выявленное в эякуляте количественное соотношение клеток, находящихся на разных стадиях сперматогенеза, аналогично таковому в биоптатах [9]. Это позволяет характеризовать ККА НПК как один из наиболее доступных неинвазивных методов детального анализа состояния сперматогенеза при различных формах патозооспермии. Информативность метода при нарушениях сперматогенеза различной этиологии показана в опубликованных работах [9–14]. Метод защищен патентом [15].

Цель настоящего исследования – оценить состояние сперматогенеза у пациентов с азооспермией/криптозооспермией с нормальным и сниженным объемом эякулята с помощью метода ККА НПК.

Материалы и методы

От пациентов с подозрением на азооспермию, обратившихся в лабораторию генетики нарушений репродукции ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» в связи с бесплодием в браке, получено 72 образца эякулята.

Выполняли стандартное спермиологическое исследование согласно руководству Всемирной организации здравоохранения [8] и ККА НПК.

В 1-ю группу включили 48 образцов эякулята пациентов с нормальным ($\geq 1,5$ мл) объемом, во 2-ю группу – 24 образца эякулята со сниженным ($< 1,5$ мл) объемом.

Для проведения ККА НПК использовали предварительно обработанные, фиксированные и окрашенные клетки из осадка эякулята. Подсчитывали ядра НПК на разных стадиях сперматогенеза и вычисляли долю клеток каждой стадии:

- сперматоцитов на допахитенных стадиях (прелептотены, лептотены, зиготены);
- сперматоцитов I на стадии пахитены профазы I мейоза;
- сперматоцитов I на стадии диплотены профазы I мейоза;
- сперматоцитов в метафазе I и II мейоза;

Определяли суммарную долю сперматоцитов II и сперматид, половых клеток в состоянии дегенерации (не идентифицируемых по стадиям). Кроме того, учитывали долю не разошедшихся в анафазе I и II мейоза ядер сперматид (от общего числа сперматоцитов II и сперматид). Нормативные показатели ККА НПК (условный контроль) взяты из исследования показателей эякулята мужчин контрольной группы – доноров спермы [10].

Поскольку по критерию Колмогорова–Смирнова анализируемые выборки имели распределение, отличное от нормального, для сравнения количественных признаков использовали U-критерий Манна–Уитни. Для анализа частоты встречаемости повышенной кислотности эякулята применяли точный критерий Фишера, для анализа частоты встречаемости повышенной вязкости – критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса.

Результаты

В 71 (98,6 %) из 72 образцов эякулята с помощью ККА НПК обнаружены сперматозоиды. Их число варьировало от 2 до 345 на 1000 полей зрения (п. з.). В образцах 1-й группы число сперматозоидов варьировало от 2 до 230 на 1000 п. з., в образцах 2-й группы в 1 случае не выявлено сперматозоидов, а в остальных их число составило от 3 до 345 на 1000 п. з.

В единственном образце, в котором не были найдены сперматозоиды, обнаружено 402 НПК на 1000 п. з. Объем эякулята составил 0,4 мл, рН – 6,9. Проведен

поиск 22 наиболее частых мутаций в гене *CFTR*; патогенных вариантов не обнаружено.

В связи с малым числом найденных сперматозоидов расчет индекса НПК (числа незрелых половых клеток на 1000 сперматозоидов) был невозможен.

По результатам ККА НПК группы статистически не различались по среднему числу НПК на разных стадиях сперматогенеза (табл. 1) ($p > 0,05$).

В 16 (33 %) образцах 1-й группы имелись признаки частичного блока сперматогенеза на допахитенных стадиях, который в 8 случаях сочетался с блоком на стадии пахитены, а в 3 случаях – еще и на стадии диплотены. Во 2-й группе в 6 (25 %) образцах выявлены признаки частичного блока сперматогенеза на допахитенных стадиях, который в 1 случае сочетался с блоком на стадии диплотены профазы I мейоза.

При нормальной концентрации сперматозоидов при проведении ККА НПК в каждом образце анализируют не менее 200 НПК. Однако при отсутствии сперматозоидов или их низкой концентрации число НПК часто невелико. Так, в образцах 1-й группы число НПК варьировало от 12 до 457 на 1000 п. з., при этом >200 НПК на 1000 п. з. обнаружено только в 10 (21 %) из 48 образцов. Во 2-й группе число НПК составляло от 12 до 640 на 1000 п. з., при этом >200 НПК на 1000 п. з. выявлено в 5 (21 %) из 24 образцов.

В 29 (60 %) из 48 образцов 1-й группы и в 17 (71 %) из 24 образцов 2-й группы клетки на стадии профазы I мейоза в осадке эякулята не найдены, что объясняется общим небольшим числом НПК. В норме в эякуляте

Таблица 1. Средние значения показателей количественного кариологического анализа незрелых половых клеток эякулята пациентов с подозрением на азооспермию в сравнении с нормативными значениями, $M \pm \sigma$

Table 1. Mean values of the results of quantitative karyological analysis of immature germ cells in the ejaculate of patients with suspected azoospermia compared to standard values, $M \pm \sigma$

Стадии развития мужских половых клеток Spermatogenesis stage	Доля половых клеток, % Percentage of germ cells, %		
	1-я группа (n = 48) Group 1 (n = 48)	2-я группа (n = 24) Group 2 (n = 24)	Нормативные значения [8, 10] Standard values [8, 10]
Сперматоциты на стадии прелептотены, лептотены, зиготены Spermatocytes in preleptotene, leptotene, zygotene	1,19 ± 2,05	0,49 ± 0,91	0,66 ± 0,16
Сперматоциты I на стадии пахитены Primary spermatocytes in pachytene	0,47 ± 1,17	0	0,45 ± 0,10
Сперматоциты I на стадии диплотены Primary spermatocytes in diplotene	0,27 ± 0,71	0,31 ± 0,88	1,11 ± 0,26
Сперматоциты на стадии диакинеза, сперматоциты в метафазе I и II мейоза Spermatocytes in diakinesis, spermatocytes in metaphase of meiosis I and II	0,01 ± 0,10	0	0,04 ± 0,02
Сперматоциты II + сперматиды Secondary spermatocytes + spermatids	93,80 ± 7,05	94,01 ± 6,95	91,99 ± 0,89
Неразошедшиеся сперматиды Unseparated spermatids	9,01 ± 7,83	14,69 ± 13,50	22,98 ± 2,65
Неидентифицированные половые клетки Unidentified germ cells	4,25 ± 5,29	5,61 ± 6,55	5,85 ± 0,85

приблизительно 2–3 % клеток находятся на стадии профазы I мейоза, однако в связи с относительно малым числом найденных в осадке эякулята НПК при сравнении результатов ККА НПК с нормативными значениями, рассчитанными для стандартной концентрации, необходимо учитывать возникающую при подсчете погрешность.

Статистически значимо ($p < 0,05$) 1-я и 2-я группы различались по частоте повышенной кислотности эякулята. Так, рН $< 7,2$ определен в 4 (8 %) из 48 образцов 1-й группы и в 8 (33 %) из 24 образцов 2-й группы. Таким образом, при сниженном ($< 1,5$ мл) объеме эякулята повышенная (рН $< 7,2$) кислотность спермы встречалась в 4 раза чаще, чем при нормальном объеме эякулята (табл. 2).

Таблица 2. Средние значения показателей стандартного спермиологического исследования эякулята пациентов с подозрением на азооспермию в сравнении с нормативными значениями, $M \pm \sigma$

Table 2. Mean values of the results of standard spermological examination of the ejaculate of patients with suspected azoospermia compared to standard values, $M \pm \sigma$

Показатели эякулята Ejaculate characteristics	1-я группа ($n = 48$) Group 1 ($n = 48$)	2-я группа ($n = 24$) Group 2 ($n = 24$)	Нормативные значения [8, 10] Standard values [8, 10]
Объем, мл Volume, ml	$3,86 \pm 1,71$	$0,78 \pm 0,34$	1,5
рН	$7,56 \pm 0,41$	$7,21 \pm 0,86$	$\geq 7,2$
Вязкость, мм Viscosity, mm	$20,49 \pm 22,77$	$14,58 \pm 19,22$	< 20
Концентрация лейкоцитов, млн/мл Leukocyte count, million/ml	$0,50 \pm 0,43$	$0,49 \pm 0,46$	$< 1,0$

Повышенная вязкость эякулята (более 20 мм) выявлена в 28 % образцов 1-й группы и в 17 % образцов 2-й группы. Различий в частоте повышенной вязкости в группах не установлено ($p > 0,05$).

Обсуждение

Азооспермия – одна из наиболее тяжелых форм мужского бесплодия, однако некоторые пациенты с этим заболеванием имеют шанс зачать ребенка. Причина возникновения азооспермии считается решающим фактором при выборе тактики лечения. Несмотря на угнетение генеративной функции яичек в результате длительной обструкции, вероятность получения гамет в процессе биопсии тестикул и их придатков

значительно выше при обструктивной азооспермии, чем при необструктивной. В ряде случаев при обструктивной азооспермии выполняют реконструктивные операции, восстанавливающие проходимость семявыносящих путей. Успех операции по восстановлению проходимости семенных путей зависит от продолжительности обструкции, ее первичной причины и хирургической техники [16].

Первопричиной обструктивной азооспермии может быть врожденная аплазия (отсутствие) либо гипоплазия (недоразвитие) семявыносящих протоков, эпидидимит, травмы. Непроходимость семявыносящих путей бывает двусторонней (полной) и односторонней. Односторонняя обструкция может быть полностью компенсированной в случае сохранности яичка и семенных протоков с другой стороны и поэтому остается бессимптомной. Частичная обструкция с обеих сторон в зависимости от ее степени может существенно ухудшать параметры эякулята и сопровождаться олигозооспермией. Если участок обструкции расположен проксимальнее эякуляторного канала, объем эякулята обычно бывает нормальным, поскольку большая часть семенной плазмы образуется в семенных пузырьках и предстательной железе. Однако дистальная обструкция приводит к выраженному уменьшению объема эякулята [6].

В ряде случаев возможно выявить форму и причину азооспермии путем тщательного анализа анамнеза, результатов клинико-андрологического обследования, уровня гормонов и показателей спермограммы. Известно, что объем эякулята составляет в основном секрет семенных пузырьков и предстательной железы с небольшим количеством секрета бульбоуретральных желез и эпидидимиса. Если рН образца спермы $< 7,0$ при сниженном объеме эякулята и отсутствии сперматозоидов, можно подозревать двустороннюю обструкцию семявыносящих протоков или синдром СВАВД [8].

Несмотря на то что определение кислотности эякулята – общепринятая процедура при выполнении стандартного спермиологического исследования, необходимость этого оспаривается некоторыми специалистами. Однако другие авторы подчеркивают особую важность данного показателя при азооспермии [17]. Опубликованные данные противоречивы. Показано, что при обструктивной азооспермии наличие мутаций гена *CFTR* ассоциировано с меньшим объемом эякулята, большей его кислотностью и более низким содержанием фруктозы [18]. При анализе спермограмм 41 пациента с синдромом СВАВД выявлено, что объем спермы < 2 мл, концентрация фруктозы < 1 г/л и рН $< 7,2$ чаще наблюдаются у пациентов с мутациями гена *CFTR*, но не являются их специфическими признаками [19]. В другой работе при изучении параметров эякулята 105 пациентов с синдромом СВАВД средний уровень

pH составил 6,5 (6,3–6,8), а средний объем эякулята – 0,7 мл (0,2–3,6), т.е. у всех пациентов с синдромом СВАВД была выявлена повышенная кислотность эякулята, но у некоторых мужчин при этом объем эякулята был нормальным [20]. У пациентов с врожденным односторонним отсутствием семявыносящего протока средний объем эякулята составил 1,7 мл (0,6–3,8 мл), а средний pH – 7,0 (6,2–8,0) [20].

Вопрос о возможности получения сперматозоидов у пациентов с азооспермией особенно актуален. Если сперматозоиды отсутствуют в рутинной спермограмме, то ККА НПК из осадка эякулята позволит точно оценить состояние сперматогенеза и выявить проходимость семявыносящих путей, поэтому может быть без риска для пациента использован для диагностических целей. В отличие от стандартного спермиологического исследования, ККА НПК позволяет детально изучить состояние сперматогенеза и идентифицировать клетки всех его стадий, как мейотических, так и пре- и пост-мейотических. Изменение количественного соотношения клеток сперматогенного ряда позволяет установить, на какой стадии деления или дифференцировки клеток произошло нарушение сперматогенеза.

Следует учитывать, что при обструктивной азооспермии вероятность обнаружения сперматозоидов в осадке эякулята в значительной степени зависит от степени проходимости семявыносящих путей и не может в полной мере отражать состояние сперматогенеза, поэтому результаты ККА НПК необходимо

интерпретировать с определенной осторожностью. При необструктивной азооспермии мы рекомендуем проводить ККА НПК до биопсии тестикул. Анализ безопасен для пациента и может быть выполнен многократно для отслеживания динамики сперматологических показателей.

Заключение

В 98,6 % исследованных образцов эякулята с помощью ККА НПК обнаружены сперматозоиды. У пациентов с азооспермией и сниженным объемом эякулята (олигоспермией) повышенная кислотность спермы выявлена в 4 раза чаще, чем в образцах с нормальным объемом. В связи с часто встречающейся низкой концентрацией НПК у пациентов с азооспермией и криптозооспермией результаты анализа должны быть интерпретированы индивидуально с учетом общего числа найденных НПК. Анализ особенно информативен в случае необструктивной азооспермии, а при подозрении на обструкцию семявыносящих путей результаты исследования следует интерпретировать с определенной осторожностью. ККА НПК эякулята особенно актуален при обследовании пациентов с крайне низкой концентрацией сперматозоидов (олигозооспермией тяжелой степени, криптозооспермией) или отсутствием сперматозоидов в эякуляте (азооспермией), поскольку, в отличие от инвазивных методов оценки сперматогенеза (биопсии яичка или его придатка), может быть без риска осложнений использован для диагностических целей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Курило Л.Ф. Гаметогенез человека: выявление и анализ аномалий хромосом и гамет в целом, тестирование гаметотоксического эффекта повреждающих факторов. Лабораторное дело 1989;(10):4–8. [Kurilo L.F. Gametogenesis in humans: identification and analysis of anomalies in chromosomes and gametes as a whole, evaluation of gametotoxic effects of damaging factors. *Laboratornoe delo = Laboratory Science* 1989;(10):4–8. (In Russ.)].
2. Черных В.Б. AZF делеции – частая генетическая причина бесплодия у мужчин: современное состояние исследований. Проблемы репродукции 2009;15(1):10–5. [Chernykh V.B. AZF deletions are common genetic cause of male infertility: the current state of research. *Problemy reproduktivnoy = Russian Journal of Human Reproduction* 2009;15(1):10–5. (In Russ.)].
3. Курило Л.Ф., Андреева М.В., Коломиец О.Л. и др. Генетические синдромы с нарушениями развития органов половой системы. *Андрология и генитальная хирургия* 2013;14(4):17–27. [Kurilo L.F., Andreeva M.V., Kolomiets O.L. et al. Genetically caused congenital anomalies of reproductive system. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2013;14(4):17–27. (In Russ.)].
4. Гамидов С.И., Попова А.Ю., Овчинников Р.И. Необструктивная азооспермия – клинические рекомендации. *Русский медицинский журнал* 2015;23(11):595–601. [Gamidov S.I., Popova A.Yu., Ovchinnikov R.I. Non-obstructive azoospermia – clinical recommendations. *Russky meditsinsky zhurnal = Russian Medical Journal* 2015;23(11):595–601. (In Russ.)].
5. Esteves S.C., Agarwal A. The azoospermic male: current knowledge and future perspectives. *Clinics (Sao Paulo)* 2013;68 Suppl 1: 1–4. DOI: 10.6061/clinics/2013(Sup01)01. PMID: 23503949.
6. Андрология. Мужское здоровье и дисфункция репродуктивной системы. Под ред. Э. Нишлага, Г. Бере. М.: Медицинское информационное агентство, 2005. С. 450. [Andrology. Male reproductive health and dysfunction. Ed. by E. Nieschlag, H.M. Behre. Moscow: Medical information agency, 2005. P. 450. (In Russ.)].
7. Jarow J.P., Espeland M.A., Lipshultz L.I. Evaluation of the azoospermic patient. *J Urol* 1989;142(1):62–5. PMID: 2499695.
8. 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. [WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. Trans. from English by N.P. Makarov. Scientific ed. by L.F. Kurilo. 5th edn. Moscow: Kapital Print, 2012. (In Russ.)].
9. 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 оли-

- гозооспермией. 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 reproduktivnoy = Russian Journal of Human Reproduction 1997;3(1):80–4. (In Russ.)].
10. 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 per the immature germ cells in ejaculate. Problemy reproduktivnoy = Russian Journal of Human Reproduction 1995;(3):33–8. (In Russ.)].
11. Гаева Т.Н. Разработка метода количественного анализа незрелых половых клеток из эякулята и выяснение степени его информативности. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1997. 17 с. [Gaeva T.N. Development of a method of quantitative analysis of immature germ cells in the ejaculate and assessment of its informative value. Abstract of dis. ... of cand. of biol. sciences. Moscow, 1997. 17 p. (In Russ.)].
12. Гришина Е.М. Характеристика сперматогенеза при некоторых генетически обусловленных и приобретенных нарушениях репродуктивной функции у мужчин. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2004. 30 с. [Grishina E.M. Characteristics of spermatogenesis in some genetically determined and acquired disorders of reproductive function in men. Abstract of dis. ... of cand. of med. sciences. Moscow, 2004. 30 p. (In Russ.)].
13. Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Цитогенетика эмбрионального развития человека: научно-практические аспекты. СПб.: Изд-во Н-Л, 2007. 640 с. [Baranov V.S., Kuznetsova T.V. Cytogenetics of human embryonic development: scientific and practical aspects. Saint Petersburg: N-L Publishing House, 2007. 640 p. (In Russ.)].
14. 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., Schileiko L.V. et al. Quantitative karyological analysis of immature germ cells from ejaculate as part of examination of patients 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.
15. Патент на изобретение № 2328736/10.07.2008. Бюл. № 19. Курило Л.Ф. Способ цитологической диагностики нарушения сперматогенеза. [Patent RUS № 2328736/10.07.2008. Bull. № 19. Kurilo L.F. Method of cytogenetic diagnosis of spermatogenesis violation. (In Russ.)]. Доступно по: <http://www.freepatent.ru/patents/2328736>. Ссылка активна на 20.01.2019.
16. Belker A.M., Thomas Aj. Jr, Fuchs E.F. et al. Results of 1,469 micro-surgical reversals by vasovasostomy study group. J Urol Nurs 1991;11(2):93–111. PMID: 12319282.
17. Meacham R. From androlog. J Androl 2002;23(3):330–1. DOI: 10.1002/j.1939-4640.2002.tb02238.x. PMID: 12002433.
18. Von Eckardstein S., Cooper T.G., Rutscha K. et al. Seminal plasma characteristics as indicators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in men with obstructive azoospermia. Fertil Steril 2000;73(6):1226–31. DOI: 10.1016/S0015-0282(00)00516-1. PMID: 10856487.
19. De la Taille A, Rigot J.M., Mahe P. et al. [Correlation of genitourinary abnormalities, spermogram and CFTR genotype in patients with bilateral agenesis of the vas deferens (In French)]. Prog Urol 1998;8(3):370–6.
20. Weiske WH, Sälzler N, Schroeder-Printzen, Weidner W. Clinical findings in congenital absence of the vasa deferentia. Andrologia 2000;32(1):13–8. DOI: 10.1046/j.1439-0272.2000.00093.x.

Вклад авторов

Т.М. Сорокина: обследование пациентов, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;
М.В. Андреева: анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;
М.И. Штаут: выполнение спермиологического исследования и кариологического анализа, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, научное редактирование статьи;
В.Б. Черных: обследование пациентов, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, научное редактирование статьи;
Л.Ф. Курило: разработка и внедрение в практику метода количественного кариологического анализа незрелых половых клеток эякулята, разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, научное редактирование статьи.

Authors' contributions

T.M. Sorokina: examination of patients, analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme, article writing;
M.V. Andreeva: analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme, article writing;
M.I. Shtaut: standard spermological examination, quantitative karyological analysis of immature germ cells in the ejaculate, analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme, scientific editing of the article;
V.B. Chernykh: examination of patients, analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme, scientific editing of the article;
L.F. Kurilo: development and implementation of the method of quantitative karyological analysis of immature germ cells of ejaculate, developing the research design, reviewing of publications of the article's theme, scientific editing of the article.

ORCID авторов/ORCID of authors

Т.М. Сорокина/T.M. Sorokina: <https://orcid.org/0000-0002-4618-2466>
М.В. Андреева/M.V. Andreeva: <https://orcid.org/0000-0002-5048-5486>
М.И. Штаут/M.I. Shtaut: <https://orcid.org/0000-0002-0580-5575>
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 Минобрнауки России.

Financing. The study was performed in the framework of the state task of the Ministry of education and science.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.