

Роль методов хирургического получения сперматозоидов у пациентов с азооспермией в программах вспомогательных репродуктивных технологий (обзор литературы)

С.И. Гамидов^{1,2}, А.Ю. Попова^{1,2}, Н.Г. Гасанов¹, Р.И. Овчинников¹, Н.П. Наумов¹, Т.В. Шатылко¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Академика Опарина, 4;

²ФГАУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России; Россия, 119991 Москва, ул. Большая Пироговская, 2, стр. 4

Контакты: Натиг Гасан оглы Гасанов natighasan@gmail.com

Обзор посвящен сравнению способов хирургического получения сперматозоидов: чрескожной и микрохирургической аспирации из придатка яичка, чрескожной аспирации и экстракции из яичка, в том числе микродиссекционной и мультифокальной. Эти методы позволяют мужчинам с азооспермией стать биологическими отцами благодаря использованию гамет, полученных из яичка или его придатка, в протоколах вспомогательных репродуктивных технологий. После лабораторной обработки материала сперматозоиды можно использовать для интрацитоплазматической инъекции и/или криоконсервации. В статье описаны история развития и технические нюансы этих хирургических вмешательств, выполнен анализ их преимуществ, недостатков и имеющихся ограничений. Упомянуты существующие лабораторные методы, применяемые для обработки полученных хирургическим путем сперматозоидов. Обсуждаются перспективы дальнейшего развития техники биопсии яичек, направленного на увеличение частоты обнаружения сперматозоидов.

Ключевые слова: азооспермия, бесплодие, вспомогательные репродуктивные технологии, сперматозоиды, экстракция, аспирация

Для цитирования: Гамидов С.И., Попова А.Ю., Гасанов Н.Г. и др. Роль методов хирургического получения сперматозоидов у пациентов с азооспермией в программах вспомогательных репродуктивных технологий (обзор литературы). Андрология и генитальная хирургия 2018;19(3):27–34.

DOI: 10.17650/2070-9781-2018-19-3-27-34

The role of surgical sperm retrieval techniques in patients with azoospermia in assisted reproductive technology programs (literature review)

S.I. Gamidov^{1,2}, A.Yu. Popova^{1,2}, N.G. Gasanov¹, R.I. Ovchinnikov¹, N.P. Naumov¹, T.V. Shatyloko¹

¹V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of Russia; 4 Akademika Oparina St., Moscow 117997, Russia;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Build. 4, 2 Bol'shaya Pirogovskaya St., Moscow 119991, Russia

This literature review is dedicated to surgical sperm retrieval techniques, such as percutaneous and microsurgical epididymal sperm aspiration, testicular sperm aspiration, testicular sperm extraction (standard, microdissection, multifocal). Those methods allow men with azoospermia to achieve biological parenthood, because gametes retrieved from testis or epididymis are usable for assisted reproduction. After laboratory processing of surgical specimen the sperm may be used for intracytoplasmic injection and/or cryopreservation. In this article we discuss historical and technical aspects of such procedures and provide critical analysis of their advantages, disadvantages and limitations. Existing laboratory techniques for processing of surgically retrieved sperm are mentioned. We discuss possible future directions for development of testicular biopsy technique aimed at improving sperm retrieval outcomes.

Key words: azoospermia, infertility, assisted reproduction, spermatozoa, extraction, aspiration

For citation: Gamidov S.I., Popova A.Yu., Gasanov N.G. et al. The role of surgical sperm retrieval techniques in patients with azoospermia in assisted reproductive technology programs (literature review). *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2018;19(3):27–34.

Введение

Азооспермия (полное отсутствие сперматозоидов в эякуляте) считается самым серьезным проявлением мужского бесплодия, поскольку подразумевает абсолютную невозможность естественного зачатия. Она встречается у 1 % мужчин в общей популяции и у 10–15 % бесплодных мужчин [1, 2].

Первая попытка добиться оплодотворения с использованием биопсийного материала от мужчины с обструктивной азооспермией (ОА) была предпринята в 1985 г.: в процедуре экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) были применены эпидидимальные сперматозоиды [3, 4]. Однако эта тактика не стала популярной из-за низкой частоты наступления беременности и была забыта до внедрения в практику интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) в 1993 г. [5, 6]. ICSI стала революционной технологией, позволившей мужчинам, ранее считавшимся стерильными, обрести надежду на биологическое отцовство. Первые сообщения о беременностях после ICSI с использованием тестикулярных сперматозоидов, полученных от мужчин с ОА, появились в 1993 г., и эти результаты стали во многом неожиданными, так как оказалось, что можно добиться фертилизации, минуя финальное созревание гамет в придатке яичка [7–9].

Данные об успешном проведении открытой биопсии яичка с последующей экстракцией сперматозоидов (testicular sperm extraction, TESE) у мужчин с необструктивной азооспермией (НОА), которое обеспечило наступление беременности, были опубликованы в 1995 г. [10, 11]. Тем не менее у мужчин с НОА сперматогенез нарушен существенно, из-за чего TESE оказывается неэффективной примерно в 60 % случаев [12–15]. В связи с этим дальнейшее развитие методов биопсии было так или иначе направлено на повышение вероятности обнаружения сперматозоидов. Так как при НОА часто сохранен только очаговый сперматогенез, была предложена мультифокальная TESE, которая действительно более результативна [10, 16, 17]. Однако агрессивная мультифокальная TESE может привести к потере значительного количества тестикулярной ткани и нарушить кровообращение в яичке, что в конце концов способно вызвать тестикулярную атрофию [18, 19]. В качестве малоинвазивного варианта процедуры ее сторонники предложили метод чрескожной аспирации сперматозоидов из яичка (testicular sperm aspiration, TESA) [20]. В 1999 г. была описана микродиссекционная TESE (microTESE), характеризующаяся высокой частотой получения сперматозоидов и низкой частотой осложнений благодаря возможности микроскопической идентификации регионов тестикулярной паренхимы с активным сперматогенезом [21]. Во многих исследованиях показано, что результаты microTESE лучше, чем результаты стандартной или мультифокальной

TESE [22–24]. Тем не менее при НОА даже microTESE эффективна лишь в 30–60 % случаев [22, 23, 25–27]. Возможность выполнения microTESE ограничивают необходимость оборудованной операционной и высококвалифицированных специалистов, а также большая длительность данного вмешательства [24, 25]. Следовательно, даже эта процедура требует дальнейшего совершенствования.

Обследование пациентов перед процедурой хирургического получения сперматозоидов

Выбор метода получения сперматозоидов зависит преимущественно от типа азооспермии (ОА или НОА). Перед операцией необходимо собрать клинический анамнез, провести физикальный осмотр, лабораторные анализы (в частности, определить уровень тестостерона, фолликулостимулирующего гормона, ингибина В) и генетическое исследование. Полученные при этом сведения позволяют примерно в 90 % случаев правильно определить тип азооспермии [28].

При ОА сперматогенез сохранен, но механическое препятствие между придатком и семявыбрасывающим протоком мешает попаданию сперматозоидов в эякулят. Приобретенная ОА может быть последствием ваз-эктомии, инфекционно-воспалительных заболеваний, хирургических вмешательств в пахово-мошоночной области или травм. Причинами врожденной ОА становятся отсутствие семявыносящего протока (ОСП), муковисцидоз, кисты предстательной железы или семявыбрасывающих протоков, синдром Янга. НОА может развиваться в результате интенсивного воздействия на яичко практически любого повреждающего фактора, к которым относятся интоксикация, прием лекарственных препаратов, наличие варикоцеле, травмы, облучение и др. Часто НОА связана с генетическими аномалиями и эндокринным дисбалансом [28].

Мужчины с ОА обычно имеют яички нормального размера и нормальный гормональный профиль. Иногда удается зафиксировать увеличение размеров придатков яичек или семенных пузырьков либо обнаружить кисту предстательной железы при пальпации или ультразвуковом исследовании. Малый объем (<1,5 мл), кислая реакция (рН <7,0) эякулята, сниженная концентрация фруктозы в эякуляте и утолщение придатков яичек в совокупности являются практически патогномичным симптомокомплексом ОА.

Примерно 2/3 мужчин с ОА и ОСП имеют мутации гена муковисцидоза (*CFTR*). Важно понимать, что данные мутации многообразны, а рутинные методы их выявления – несовершенны, поэтому при наличии двустороннего ОСП даже отрицательный результат генетического исследования не должен привести к исключению носительства гена муковисцидоза. Женщине тоже следует предложить обследоваться на наличие мутаций гена *CFTR* перед ICSI, так как около

4 % женщин в общей популяции являются их носителями. Если *CFTR*-мутация выявляется и у мужчины, и у женщины, риск манифестации клинически выраженного муковисцидоза у потомства возрастает во много раз, о чем следует предупредить пару в ходе консультации с участием медицинского генетика [29]. У мужчин с идиопатической обструкцией или клинической триадой Янга (хронический синусит, бронхоэктазы, ОА) риск наличия *CFTR*-мутации тоже может быть повышен.

У мужчин с нормальным размером яичек, уровнем фолликулостимулирующего гормона и объемом эякулята бывает трудно определить тип азооспермии [29]. В таких случаях окончательный диагноз ставят после тестикулярной биопсии. В ходе гистологического исследования биоптата при ОА будет выявлен нормальный сперматогенез, а при НОА — гипосперматогенез, арест созревания или синдром наличия только клеток Сертоли.

Выполнение биопсии яичка только с диагностической целью недопустимо. Эту процедуру следует назначить тогда, когда есть условия для осуществления ICSI или криоконсервации сперматозоидов в случае их обнаружения. Отрицательный результат биопсии не является абсолютным предиктором отсутствия сперматогенеза, так как при НОА его очаги могут быть распределены в яичках неравномерно [28].

У мужчин с НОА проводят кариотипирование и тест на наличие микроделений Y-хромосомы. Аномалии кариотипа обнаруживают у 10–15 % мужчин с НОА, и у 2/3 из них диагностируют синдром Клайнфельтера [30]. Мутации локуса AZF Y-хромосомы встречаются у 7–15 % мужчин с НОА. Если микроделения ограничены регионом AZFc, в яичке могут быть обнаружены жизнеспособные сперматозоиды. Однако если микроделения есть в регионах AZFa и AZFb, шанс получения сперматозоидов практически равен нулю [31, 32].

Чрескожная аспирация сперматозоидов из придатка яичка (percutaneous epididymal sperm aspiration, PESA)

Эту процедуру впервые описали в 1994 г. I. Craft и P. Shrivastav [33]. PESA обычно выполняют под местной анестезией или внутривенной седацией.

Для PESA применяют тонкую иглу (26G), соединенную с инсулиновым шприцем. Иглу вводят через кожу мошонки в придаток яичка. По мере продвижения кончика иглы в придатке врач оттягивает поршень, создавая отрицательное давление и добываясь получения прозрачной жидкости. Часто объем жидкости составляет лишь около 0,1 мл, но при ОСП можно получить и 0,3–1,0 мл эпидидимальной плазмы. Жидкость помещают в пробирку с теплой средой для сперматозоидов и доставляют в лабораторию для немедленной микроскопии. Эту процедуру повторяют в разных

участках придатка (от хвоста до головки) до получения необходимого количества сперматозоидов. Если этого сделать не удастся, возможен переход к этапу получения тестикулярных сперматозоидов.

Микрохирургическая аспирация сперматозоидов из придатка яичка (microsurgical epididymal sperm aspiration, MESA)

MESA предложена P.D. Temple-Smith и соавт. еще в 1985 г. [3]. Операцию начинают с выведения яичка через поперечный разрез на мошонке длиной 2–3 см. Оболочку придатка рассекают, с помощью микроскопа обнаруживают расширенные канальцы и рассекают их с помощью микрохирургических ножниц. Выделяющуюся жидкость аспирируют с помощью силиконовой трубки, затупленной иглы или внутривенной канюли, соединенной с инсулиновым шприцем. MESA повторяют в разных участках придатка до тех пор, пока из лаборатории не сообщат, что полученных сперматозоидов достаточно для попыток фертилизации и/или криоконсервации. После неудачной MESA возможен переход к microTESE при условии, что используемый операционный микроскоп способен обеспечить достаточное увеличение.

Чрескожная аспирация сперматозоидов из яичка

Эта методика появилась через 2 года после PESA. A. Lewin и соавт. первыми использовали тонкоигльную TESA для получения сперматозоидов из яичка [34].

Главные преимущества TESA — простота и относительная безопасность. Результат TESA в наименьшей степени зависит от хирургических навыков врача, выполняющего процедуру. Существуют несколько вариантов проведения этой процедуры: с использованием тонкой иглы и с использованием биопсийного пистолета [13, 35–37]. Иглу обычно вводят в переднемедиальную или переднелатеральную поверхность верхнего полюса яичка под острым углом по направлению к нижнему полюсу. При таком способе риск повреждения крупных ветвей яичковой артерии, проходящих под белочной оболочкой, минимален. Врач оттягивает поршень, совершая возвратно-поступательные движения иглой для разрушения семенных канальцев. Так же как и при PESA, полученный материал смешивают со средой и доставляют в лабораторию.

Известно, что применение иглы калибра меньше 21G позволяет выполнить процедуру без анестезии. Однако B. Rosenlund и соавт. сообщили, что результативность процедуры при использовании иглы 21G существенно ниже, чем при применении более толстой иглы (19G) (11 % против 62 %) [15].

Частота успешного получения сперматозоидов при TESA гораздо меньше, чем при TESE [13, 15, 38]. Вследствие этого могут потребоваться повторные пункции. Как указано выше, основными преимуществами

TESA считаются простота и низкая травматичность. Повторные процедуры TESA могут терять эти преимущества, так как каждая из них выполняется фактически вслепую. Важно учитывать, что при TESA, в отличие от открытого хирургического вмешательства, врач не имеет возможности прямо контролировать риск кровотечения и немедленно восстановить целостность оболочек яичка. Следовательно, TESA проигрывает TESE и microTESE во многих аспектах, хотя она выполняема даже андрологами без серьезного хирургического опыта [39].

Открытая биопсия яичка с последующей экстракцией сперматозоидов

Тестикулярные сперматозоиды изначально рассматривались как альтернатива эпидидимальным сперматозоидам (полученным при PESA или MESA). Однако впоследствии выяснилось, что тестикулярные сперматозоиды могут быть получены у мужчин с НОА и использованы для оплодотворения яйцеклеток; при этом получают жизнеспособные эмбрионы [11, 12, 14]. TESE долго считалась «золотым стандартом» получения сперматозоидов при НОА благодаря большей вероятности успеха и возможности получения материала в объеме, достаточном для гистологического исследования. Однако в метаанализе J.D. Nicoroullou и соавт. сделан вывод, что результаты ICSI (частота оплодотворения, частота клинической беременности, частота рождения живого ребенка) не зависят от источника получения сперматозоидов (яичко или придаток) [40]. Частота получения сперматозоидов при TESE у мужчин с НОА варьирует от 20 до 60 % [41, 42].

Использовать TESE в процедуре ICSI впервые предложили P. Devgoue и соавт. [9]. Для стандартной TESE применяют обычную хирургическую методику без помощи операционного микроскопа, хотя могут использоваться бинокулярные лупы. Эта процедура может выполняться без полного выведения яичка в рану, через небольшой разрез-«окно» длиной около 2 см. Кожа, *fascia dartos* и *tunica vaginalis testis* смещаются ретрактором и *tunica albuginea* рассекается примерно на 1 см. Механическое давление на яичко позволяет получить через этот разрез фрагмент паренхимы, который иссекают и помещают в среду для сперматозоидов.

Для увеличения частоты получения сперматозоидов были разработаны различные модификации TESE, среди которых одна из самых известных – мультифокальная TESE [17, 43, 44]. Эта модификация базируется на том, что при НОА в яичке неравномерно распределены области с минимальным сохранным сперматогенезом. R. Hauser и соавт. определили, что 1 дополнительная TESE повышает вероятность обнаружения сперматозоидов при НОА на 28,6 %, а 3 дополнительных биопсии – на 53,6 % [17]. Они также установили, что вероятность нахождения сперматозоидов

не зависит от конкретного места забора биоптатов, а значит, хорошая результативность мультифокальной TESE обусловлена не столько большим количеством биоптатов, сколько большим количеством мест забора материала. С другой стороны, M. Witt и соавт. сообщили, что максимальная частота получения сперматозоидов в их выборке наблюдалась при взятии биоптатов по средней линии яичка [45]. Таким образом, оптимальное место забора ткани яичка и количество биоптатов остаются предметом обсуждения; требуется больше исследований, чтобы окончательно решить данный вопрос. Однако возрастающая популярность microTESE привела к тому, что это направление несколько потеряло актуальность.

Микродиссекционная открытая биопсия яичка с последующей экстракцией сперматозоидов

Методика microTESE, впервые описанная в 1998 г., постепенно стала наиболее часто применяемым методом получения сперматозоидов у мужчин с НОА [21, 46]. Это более совершенный вариант TESE, при котором используется микрохирургическая техника для обнаружения отдельных семенных канальцев, которые с большей вероятностью содержат сперматозоиды, чем остальные. Автор методики, P. Schlegel, отметил, что мультифокальная биопсия с несколькими инцизиями белочной оболочки может существенно нарушить васкуляризацию яичка [18]. В связи с этим он рекомендовал ограничивать до минимума число инцизий при выполнении мультифокальной TESE, чтобы снизить риск тестикулярной атрофии. MicroTESE, в отличие от мультифокальной TESE, дает возможность визуализировать сосуды при вскрытии белочной оболочки, что минимизирует риск их повреждения.

Для microTESE используют такой же хирургический доступ, как и для MESA. После выведения яичка выполняют крупный срединный разрез *tunica albuginea* в аваскулярной зоне под 6–8-кратным увеличением. Диссекцию паренхимы яичка и поиск участков с нормальными семенными канальцами осуществляют под увеличением в 16–25 раз. С помощью микрохирургических инструментов проводят биопсию тестикулярной ткани из этих участков. Если нормальные канальцы обнаружить не удается, при биопсии иссекают любые внешне отличные от основной массы. Если все канальцы внешне одинаковы, для биопсии разные участки ткани выбирают произвольно. Тестикулярную ткань помещают в чашки Петри со средой для сперматозоидов, которые отправляют в лабораторию. Рану послойно ушивают [47].

Частоту получения сперматозоидов при microTESE и стандартной TESE сравнивали во многих исследованиях. Неоднократно продемонстрировано, что она выше при microTESE [21–24, 48, 49]. Метаанализ результатов microTESE у 1890 пациентов показал, что ее

эффективность в 1,5 раза выше, чем эффективность стандартной TESE [50]. Это различие более заметно при очаговом сперматогенезе, который можно заподозрить, если при 1-й биопсии гистологическое исследование указало на синдром наличия только клеток Сертоли [42]. Хотя частота получения сперматозоидов при microTESE выше, чем при применении всех остальных методов, ее назначение пока не стало общепринятым при НОА. Основными недостатками microTESE считаются длительность ее выполнения и сложность приобретения навыков, необходимых для данной процедуры, что отражает пологая кривая обучения [25].

Лабораторная обработка полученных хирургическим путем сперматозоидов

Полученные хирургическим путем сперматозоиды обычно имеют не лучшее качество, особенно при НОА, а также после заморозки и оттаивания, поэтому их обработка должна быть очень аккуратной. Перед лабораторией в этом случае стоит цель не только отбора сперматозоидов для ICSI, но и поддержания их оптимальной оплодотворяющей способности. Для этого в образце не должно быть посторонних элементов, таких как эритроциты или микроорганизмы. Необходимо соблюдать технические правила работы с биологическим материалом, в частности контролировать скорость и продолжительность центрифугирования, температурный и световой режим, качество воздуха, реагентов и расходных материалов. Если доступны только неподвижные сперматозоиды, следует отбирать живые с помощью специальных методов [47]. Качество сперматозоидов иногда удается улучшить с помощью стимуляторов, таких как пентоксифиллин [51].

Тестикулярные образцы обрабатывают с помощью механического измельчения или ферментативного воздействия. Цель обработки — разрушение канальцев и высвобождение из них сперматозоидов. После этого сперматозоиды можно использовать для ICSI или криоконсервировать [47].

Перспективы развития методов биопсии яичка

По мере развития методов хирургического получения сперматозоидов предпринимались попытки преодолеть связанные с этим технические трудности. В частности, чтобы повысить результативность TESE, для визуализации очагов сперматогенеза при НОА применяли доплеровскую ультрасонографию. Существует гипотеза, что очаги сперматогенеза при НОА расположены в регионах с обильным кровоснабжением [52]. Опираясь на это предположение, J. Nag-Тоov и соавт. предложили энергетическую доплерографию в качестве метода повышения результативности биопсии яичка [53]. R. Herwig и соавт. применили лазерную доплерометрию для составления карты перфузии яичка и сообщили, что TESE с использованием этой карты

приводит к получению сперматозоидов в большем количестве и лучшего качества [54]. Эти работы указывают на то, что результаты TESE с контролем перфузии являются более предсказуемыми и превосходят результаты стандартной TESE.

Предлагается контролировать процесс microTESE с помощью уже известного урологам метода узкоспектральной эндоскопии (narrow-band imaging), который уже применяется, например, при цистоскопии с целью обнаружения уротелиального рака *in situ*. Этот метод использует свет с длиной волны в диапазоне 390–445 нм, который позволяет визуализировать поверхностно расположенные капилляры, и в диапазоне 530–550 нм, который позволяет увидеть толстые кровеносные сосуды. N. Enatsu и соавт. именно этим методом смогли идентифицировать участки с активным сперматогенезом при диссекции яичек у самцов крыс [55].

Некоторые авторы сообщают об использовании принципиально других оптических систем для хирургического получения сперматозоидов. В частности, R. Ramasamy и соавт. применили вместо стандартного операционного микроскопа мультифотонную микроскопию, чтобы определить стадию сперматогенеза у самцов крыс [56]. При мультифотонной микроскопии импульсы фотонов с большой длиной волны проникают в ткани и вызывают в них возбуждение флуорофоров. Авторы методики предполагают, что интенсивность ответа флуорофоров позволяет определить сохранность сперматогенеза и архитектоники семенных канальцев, благодаря чему возможно выявить участки, вероятность обнаружения живых сперматозоидов в которых максимальна. Эти же авторы сообщили об использовании оптической когерентной томографии. Этот метод работает как «оптическая биопсия» с высоким разрешением на свежееудаленной ткани. R. Ramasamy и соавт. с помощью оптической когерентной томографии смогли обнаружить сохраненные семенные канальцы со сперматозоидами в ткани яичка крысы без контрастирования, фиксации или окраски [57].

Заключение

Среди всех методов получения сперматозоидов у мужчин с НОА наиболее часто успешный результат дает microTESE, которая превосходит стандартную TESE; TESE, в свою очередь, более эффективна, чем TESA. При ОА эффективны методы хирургического получения сперматозоидов из придатка, хотя тестикулярная биопсия тоже может потребоваться при определенном уровне обструкции. Продолжается разработка новых методов биопсии яичка с использованием ультразвука, узкоспектральной эндоскопии, оптической когерентной томографии и мультифотонной микроскопии. Их изучение пока находится на экспериментальном этапе, но они имеют высокий потенциал в обнаружении сперматозоидов у мужчин с НОА.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Willott G.M. Frequency of azoospermia. *Forensic Sci Int* 1982;20(1):9–10. DOI: 10.1016/0379-0738(82)90099-8. PMID: 7095683.
- Jarow J.P., Espeland M.A., Lipshultz L.I. Evaluation of the azoospermic patient. *J Urol* 1989;142(1):62–5. PMID: 2499695.
- Temple-Smith P.D., Southwick G.J., Yates C.A. et al. Human pregnancy by in vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from the epididymis. *J In Vitro Fert and Embryo Transf* 1985;2(3):119–22. DOI: 10.1007/BF01131497. PMID: 4056559.
- Silber S., Ord T., Borrero C. et al. New treatment for infertility due to congenital absence of vas deferens. *Lancet* 1987;2(8563):850–1. DOI: 10.1016/S0140-6736(87)91031-2. PMID: 2889044.
- Palermo G., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A.C. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;340(8810):17–8. DOI: 10.1016/0140-6736(92)92425-F. PMID: 1351601.
- Van Steirteghem A.C., Nagy Z., Joris H. et al. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993;8(7):1061–6. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138192. PMID: 8408487.
- Craft I., Bennett V., Nicholson N. Fertilising ability of testicular spermatozoa. *Lancet* 1993;342(8875):864. DOI: 10.1016/0140-6736(93)92722-6. PMID: 8104288.
- Schoysman R., Vanderzwalmen P., Nijs M. et al. Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa. *Lancet* 1993;342(8881):1237. DOI: 10.1016/0140-6736(93)92217-H. PMID: 7901551.
- Devroey P., Liu J., Nagy Z. et al. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1994;62(3):639–41. DOI: 10.1016/S0015-0282(16)56958-1. PMID: 8062963.
- Tournaye H., Camus M., Goossens A. et al. Recent concepts in the management of infertility because of non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1995;10 Suppl 1:115–9. DOI: 10.1093/humrep/10.suppl_1.115. PMID: 8592027.
- Devroey P., Liu J., Nagy Z. et al. Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1995;10(6):1457–60. DOI: 10.1093/humrep/10.6.1457. PMID: 7593514.
- Kahraman S., Özgür S., Alataş C. et al. Fertility with testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermic men. *Hum Reprod* 1996;11(4):756–60. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a019249. PMID: 8671323.
- Friedler S., Raziel A., Strassburger D. et al. Testicular sperm retrieval by percutaneous fine needle sperm aspiration compared with testicular sperm extraction by open biopsy in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1997;12(7):1488–93. DOI: 10.1093/humrep/12.7.1488. PMID: 9262283.
- Schlegel P.N., Palermo G.D., Goldstein M. et al. Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for nonobstructive azoospermia. *Urology* 1997;49(3):435–40. DOI: 10.1016/S0090-4295(97)00032-0. PMID: 9123710.
- Rosenlund B., Kvist U., Plöen L. et al. A comparison between open and percutaneous needle biopsies in men with azoospermia. *Hum Reprod* 1998;13(5):1266–71. DOI: 10.1093/humrep/13.5.1266. PMID: 9647558.
- Tournaye H., Liu J., Nagy P.Z. et al. Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1996;11(1):127–32. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a019004. PMID: 8671174.
- Hauser R., Botchan A., Amit A. et al. Multiple testicular sampling in non-obstructive azoospermia – is it necessary? *Hum Reprod* 1998;13(11):3081–5. DOI: 10.1093/humrep/13.11.3081. PMID: 9853860.
- Schlegel P.N., Su L.M. Physiological consequences of testicular sperm extraction. *Hum Reprod* 1997;12(8):1688–92. DOI: 10.1093/humrep/12.8.1688. PMID: 9308794.
- Tash J.A., Schlegel P.N. Histologic effects of testicular sperm extraction on the testicle in men with nonobstructive azoospermia. *Urology* 2001;57(2):334–7. DOI: 10.1016/S0090-4295(00)00901-8. PMID: 11182348.
- Craft I., Tsirigotis M., Courtauld E., Farrer-Brown G. Testicular needle aspiration as an alternative to biopsy for the assessment of spermatogenesis. *Hum Reprod* 1997;12(7):1483–7. DOI: 10.1093/humrep/12.7.1483. PMID: 9262282.
- Schlegel P.N. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod* 1999;14(1):131–5. DOI: 10.1093/humrep/14.1.131. PMID: 10374109.
- Okada H., Dobashi M., Yamazaki T. et al. Conventional versus microdissection testicular sperm extraction for nonobstructive azoospermia. *J Urol* 2002;168(3):1063–7. DOI: 10.1016/S0022-5347(05)64575-2. PMID: 12187223.
- Ramasamy R., Yagan N., Schlegel P.N. Structural and functional changes to the testis after conventional versus microdissection testicular sperm extraction. *Urology* 2005;65(6):1190–4. DOI: 10.1016/j.urology.2004.12.059. PMID: 15922422.
- Tsujimura A., Matsumiya K., Miyagawa Y. et al. Conventional multiple or microdissection testicular sperm extraction: a comparative study. *Hum Reprod* 2002;17(11):2924–9. DOI: 10.1093/humrep/17.11.2924. PMID: 12407050.
- Ishikawa T., Nose R., Yamaguchi K. et al. Learning curves of microdissection testicular sperm extraction for nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2010;94(3):1008–11. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.03.108. PMID: 19427639.
- Tsujimura A., Matsumiya K., Miyagawa Y. et al. Prediction of successful outcome of microdissection testicular sperm extraction in men with idiopathic nonobstructive azoospermia. *J Urol* 2004;172(5 pt 1):1944–7. DOI: 10.1097/01.ju.0000142885.20116.60. PMID: 15540761.
- Enatsu N., Miyake H., Chiba K. et al. Predictive factors of successful sperm retrieval on microdissection testicular sperm extraction in Japanese men. *Reprod Med Biol* 2015;15(1):29–33. DOI: 10.1007/s12522-015-0212-x. PMID: 29259419.
- Schlegel P.N. Causes of azoospermia and their management. *Reprod Fertil Dev* 2004;16(5):561–72. DOI: 10.1071/RD03087. PMID: 15367371.
- Jarow J., Sigman M., Kolettis P. et al. The management of obstructive azoospermia: AUA best practice statement. *Linthicum (MD): American Urological Association*, 2010.
- De Braekeleer M., Dao T.N. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991;6(2):245–50. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137315. PMID: 2056021.
- Brandell R.A., Mielnik A., Liotta D. et al. AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction: preliminary report of a prognostic genetic test. *Hum Reprod* 1998;13(10):2812–5. DOI: 10.1093/humrep/13.10.2812. PMID: 9804236.
- Hopps C.V., Mielnik A., Goldstein M. et al. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Hum Reprod* 2003;18(8):1660–5. DOI: 10.1093/humrep/deg348. PMID: 12871878.
- Craft I., Shrivastav P. Treatment of male infertility. *Lancet* 1994;344(8916):191–2. DOI: 10.1016/S0140-6736(94)92792-8. PMID: 7912782.
- Lewin A., Weiss D.B., Friedler S. et al. Delivery following intracytoplasmic injection of mature sperm cells recovered by testicular fine needle aspiration in a case of hypergonadotropic azoospermia due

- to maturation arrest. *Hum Reprod* 1996;11(4):769–71. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a019252. PMID: 8671326.
35. Morey A.F., Deshon G.E. Jr, Rozanski T.A., Dresner M.L. Technique of biopsy gun testis needle biopsy. *Urology* 1993;42(3):325–6. DOI: 10.1016/0090-4295(93)90625-K. PMID: 8379035.
36. Hovatta O., Moilanen J., von Smitten K., Reima I. Testicular needle biopsy, open biopsy, epididymal aspiration and intracytoplasmic sperm injection in obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1995;10(10):2595–9. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a135752. PMID: 8567777.
37. Bourne H., Watkins W., Speirs A., Baker H.W. Pregnancies after intracytoplasmic injection of sperm collected by fine needle biopsy of the testis. *Fertil Steril* 1995;64(2):433–6. DOI: 10.1016/S0015-0282(16)57747-4. PMID: 7615125.
38. El-Haggar S., Mostafa T., Abdel Nasser T. et al. Fine needle aspiration vs. mTESE in non-obstructive azoospermia. *Int J Androl* 2008;31(6):595–601. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2007.00814.x. PMID: 17822417.
39. Enatsu N., Chiba K., Fujisawa M. The development of surgical sperm extraction and new challenges to improve the outcome. *Reprod Med Biol* 2015;15(3):137–44. DOI: 10.1007/s12522-015-0228-2. PMID: 29259430.
40. Nicopoulos J.D., Gilling-Smith C., Almeida P.A. et al. Use of surgical sperm retrieval in azoospermic men: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2004;82(3):691–701. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2004.02.116. PMID: 15374716.
41. Donoso P., Tournaye H., Devroey P. Which is the best sperm retrieval technique for non-obstructive azoospermia? a systematic review. *Hum Reprod Update* 2007;13(6):539–49. DOI: 10.1093/humupd/dmm029. PMID: 17895238.
42. Deruyver Y., Vanderschueren D., Van der Aa F. Outcome of microdissection TESE compared with conventional TESE in non-obstructive azoospermia: a systematic review. *Andrology* 2014;2(1):20–4. DOI: 10.1111/j.2047-2927.2013.00148.x. PMID: 24193894.
43. Gil-Salom M., Romero J., Mínguez Y. et al. Testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection: a chance of fertility in nonobstructive azoospermia. *J Urol* 1998;160(6 Pt 1):2063–7. DOI: 10.1016/S0022-5347(01)62243-2. PMID: 9817324.
44. Silber S.J., Nagy Z., Devroey P. et al. Distribution of spermatogenesis in the testicles of azoospermic men: the presence or absence of spermatids in the testes of men with germinal failure. *Hum Reprod* 1997;12(11):2422–8. DOI: 10.1093/humrep/12.11.2422. PMID: 9436677.
45. Witt M., Richard J.R., Smith S.E. et al. The benefit of additional biopsy sites when performing testicular sperm extraction in non obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 1997;1001:S79–80.
46. Schlegel P., Li S. Microdissection TESE: sperm retrieval in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod Update* 1998;4(4):439. DOI: 10.1093/humupd/4.4.439. PMID: 9825858.
47. Esteves S.C., Miyaoka R., Agarwal A. Sperm retrieval techniques for assisted reproduction. *Int Braz J Urol* 2011;37(5):570–83. DOI: 10.1590/S1677-55382011000500002. PMID: 22099268.
48. Ghalayini I.F., Al-Ghazo M.A., Hani O.B. et al. Clinical comparison of conventional testicular sperm extraction and microdissection techniques for non-obstructive azoospermia. *J Clin Med Res* 2011;3(3):124–31. DOI: 10.4021/jocmr542w. PMID: 21811543.
49. Amer M., Ateyah A., Hany R., Zohdy W. Prospective comparative study between microsurgical and conventional testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia: follow-up by serial ultrasound examinations. *Hum Reprod* 2000;15(3):653–6. DOI: 10.1093/humrep/15.3.653. PMID: 10686214.
50. Bernie A.M., Mata D.A., Ramasamy R., Schlegel P.N. Comparison of microdissection testicular sperm extraction, conventional testicular sperm extraction, and testicular sperm aspiration for nonobstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2015;104(5):1099–103. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.07.1136. PMID: 26263080.
51. Kovacic B., Vlaisavljevic V., Reljic M. Clinical use of pentoxifylline for activation of immotile testicular sperm before ICSI in patients with azoospermia. *J Androl* 2006;27(1):45–52. DOI: 10.2164/jandrol.05079. PMID: 16400077.
52. Foresta C., Garolla A., Bettella A. et al. Doppler ultrasound of the testis in azoospermic subjects as a parameter of testicular function. *Hum Reprod* 1998;13(11):3090–3. DOI: 10.1093/humrep/13.11.3090. PMID: 9853862.
53. Har-Toov J., Eytan O., Hauser R. et al. A new power Doppler ultrasound guiding technique for improved testicular sperm extraction. *Fertil Steril* 2004;81(2):430–4. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2003.07.020. PMID: 14967385.
54. Herwig R., Tosun K., Schuster A. et al. Tissue perfusion-controlled guided biopsies are essential for the outcome of testicular sperm extraction. *Fertil Steril* 2007;87(5):1071–6. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2006.10.010. PMID: 17173898.
55. Enatsu N., Miyake H., Chiba K., Fujisawa M. Identification of spermatogenically active regions in rat testes by using narrow band imaging system. *Urology* 2015;86(5):929–35. DOI: 10.1016/j.urolgy.2015.08.021. PMID: 26362950.
56. Ramasamy R., Sterling J., Fisher E.S. et al. Identification of spermatogenesis with multiphoton microscopy: an evaluation in a rodent model. *J Urol* 2011;186(6):2487–92. DOI: 10.1016/j.juro.2011.07.081. PMID: 22019169.
57. Ramasamy R., Sterling J., Manzoor M. et al. Full field optical coherence tomography can identify spermatogenesis in a rodent sertoli-cell only model. *J Pathol Inform* 2012;3:4. DOI: 10.4103/2153-3539.93401. PMID: 22439124.

Вклад авторов

С.И. Гамидов: разработка дизайна исследования;

А.Ю. Попова: разработка дизайна исследования, написание текста статьи;

Н.Г. Гасанов: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;

Р.И. Овчинников: разработка дизайна исследования;

Н.П. Наумов: обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа;

Т.В. Шатылко: получение данных для анализа.

Authors' contributions

S.I. Gamidov: developing the research design;

A.Yu. Popova: developing the research design, article writing;

N.G. Gasanov: developing the research design, obtaining data for analysis, reviewing of publications of the article's theme, article writing;

R.I. Ovchinnikov: developing the research design;

N.P. Naumov: reviewing of publications of the article's theme, obtaining data for analysis;

T.V. Shatyloko: obtaining data for analysis.



ORCID авторов / ORCID of authors

Н.Г. Гасанов / N.G. Gasanov: <https://orcid.org/0000-0003-4695-9789>

Р.И. Овчинников / R.I. Ovchinnikov: <https://orcid.org/0000-0001-8219-521>

Н.П. Наумов / N.P. Naumov: <https://orcid.org/0000-0003-1854-368X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.