

На правах рукописи



Гасанов Натиг Гасан Оглы

**Персонализация методов хирургического получения сперматозоидов у пациентов
с азооспермией в программах вспомогательных репродуктивных технологий**

3.1.13. Урология и андрология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

академик РАН, доктор медицинских наук, профессор

Лоран Олег Борисович

Официальные оппоненты:

Боровец Сергей Юрьевич – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра урологии с курсом урологии с клиникой, профессор кафедры; Научно-исследовательский институт хирургии и неотложной медицины, Научно-исследовательский центр урологии, ведущий научный сотрудник

Ефремов Евгений Александрович – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, факультет дополнительного профессионального образования, кафедра урологии, андрологии и онкологии, профессор кафедры

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение дополнительного профессионального образования «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации

Защита диссертации состоится «19» февраля 2024 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.26 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119435, г. Москва, ул. Большая Пироговская, д.2, строение 1

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан «___»_____2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Тельпухов Владимир Иванович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Хирургическая экстракция тестикулярных сперматозоидов (TESE) является основным методом преодоления тяжёлых форм мужского бесплодия, в первую очередь – азооспермии (Abdel Raheem et al., 2013). Интрацитоплазматическая инъекция сперматозоидов в ооцит (ICSI) позволяет применять полученные хирургическим способом мужские гаметы для достижения беременности в рамках протоколов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Учитывая относительно невысокую эффективность TESE при необструктивной азооспермии (НОА), а также трудности в дифференциальной диагностике НОА и обструктивной азооспермии (ОА), важной и по настоящий момент нерешённой задачей является прогнозирование успеха попыток получения сперматозоидов. Возможными предикторами эффективности TESE являются уровни гонадотропных гормонов и ингибина В, а также различные клинические, ультразвукографические и патоморфологические параметры (Лихоносов и соавт., 2019; Сагорро et al., 2016). Тем не менее, ни один из предложенных предикторов не является настолько чувствительным или специфичным, чтобы им можно было руководствоваться при принятии клинического решения. Сперматозоиды в тестикулярной ткани могут быть обнаружены даже при наличии нескольких неблагоприятных прогностических факторов, что связывают с концепцией «очагового сперматогенеза» при НОА. Одним из относительно надёжных предиктивных факторов, определяющих успех TESE, является гистологическое заключение, полученное при диагностической биопсии. Однако, даже диагностическая биопсия, в виду своего случайного характера, не может полноценно отразить состояние семенных канальцев яичка. Микродиссекционная TESE (microTESE) превосходит по эффективности стандартную TESE и мультифокальную TESE благодаря возможности направленного поиска очагов сохранённого сперматогенеза, что нивелирует диагностическую ценность предварительной биопсии (Боровец и соавт., 2017; Chatterjee & Gagnon, 2001; Colpi et al., 2005; De Croo et al., 2008; Esteves, 2010).

Принципиально новых методов лечения НОА за последние десятилетия не предложено, и даже эффективность microTESE остаётся умеренной. Стоимость применения ВРТ и принципиальное несогласие многих пар на применение донорских сперматозоидов делают вопрос о прогнозировании результатов TESE и microTESE чрезвычайно актуальным. Важными направлениями являются поиск и изучение потенциальных предикторов исхода ВРТ с попытками применения сперматозоидов, полученных хирургическим путём, а также детальная оценка преимуществ и недостатков различных методов биопсии яичек и их придатков.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время в лечении бесплодных мужчин с азооспермией применяют вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) с хирургическим забором сперматозоидов. Определение наличия сперматозоидов у пациентов с азооспермией возможно лишь при хирургическом вмешательстве, которые выполняются для забора сперматозоидов. К сожалению, стандартное диагностическое обследование пациентов, а именно, параметры фолликулостимулирующего гормона, уровня ингибина В и объёма яичек не позволяют достоверно прогнозировать исход попытки получения сперматозоидов, но комбинация этих параметров может определить вероятность успеха биопсии яичка у пациентов с азооспермией.

Выполняемое исследование признано определить эффективность различных методов хирургического получения сперматозоидов при азооспермии, в частности по частоте получения сперматозоидов (ЧПС) и частоте рождения детей (ЧРД).

Цель исследования: оптимизировать результаты хирургического получения сперматозоидов и репродуктивные исходы в парах с азооспермией.

Задачи исследования:

1. Выполнить анализ факторов, позволяющих прогнозировать результат хирургического получения сперматозоидов у мужчин с азооспермией.
2. Оценить эффективность различных методов хирургического получения сперматозоидов при азооспермии по частоте получения сперматозоидов (ЧПС) и частоте рождения детей (ЧРД).
3. Оценить безопасность и частоту развития осложнений после попыток хирургического получения сперматозоидов разными методами.
4. Определить показания к различным видам биопсии яичка исходя из частоты получения сперматозоидов в разных клинических ситуациях.
5. Установить эффективность повторных биопсий яичка у пациентов после неудачных попыток хирургического получения сперматозоидов при необструктивной азооспермии.

Научная новизна

Подтверждено отсутствие сильной линейной зависимости между эффективностью методов хирургического получения сперматозоидов и эндокринными параметрами. Впервые продемонстрированы неблагоприятные репродуктивные исходы у пациентов с азооспермией на фоне умеренного изолированного повышения уровня фолликулостимулирующего гормона. Доказано отсутствие влияния андрологических факторов на частоту рождения детей при азооспермии в тех случаях, когда удаётся получить в достаточном количестве сперматозоиды приемлемого качества. Научно подтверждена и обоснована безопасность открытых микрохирургических методов биопсии яичек и придатков яичек. Впервые продемонстрировано

наличие шансов на успешное получение сперматозоидов при повторной открытой микродиссекционной биопсии яичка при сертоликлеточном синдроме по данным первичного гистологического заключения.

Теоретическая и практическая значимость работы

1. Определены наиболее значимые факторы, на которые можно ориентироваться для прогнозирования вероятности успешного хирургического получения сперматозоидов, что позволит точнее информировать пациента о его репродуктивном прогнозе.

2. Установлены и подробно описаны репродуктивные исходы после применения различных вариантов для хирургического получения сперматозоидов.

3. Определены основные виды осложнений биопсии яичка, что позволит минимизировать риск нежелательных явлений.

4. Продемонстрировано, что в ряде клинических случаев варикоцелэктомия улучшает репродуктивные исходы в парахсазооспермией за счёт снижения количества необходимых циклов ICSI, исходя из чего можно рекомендовать это вмешательство в рамках подготовки мужчины к биопсии яичка.

Методология и методы исследования

Представленная на защиту научно-исследовательская работа выполнена с соблюдением этических норм и принципов доказательной медицины. Методология диссертационной работы предусматривала разработку дизайна исследования, определение объема выборки для обеспечения ее репрезентативности, подбор математических и программных средств статистической обработки полученных данных. Для проведения исследовательской работы использованы современные диагностические методы обследования пациентов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Клинико-лабораторные параметры, в том числе уровни фолликулостимулирующего гормона, ингибина В и объём яичек по отдельности не позволяют достоверно прогнозировать исход попытки получения сперматозоидов, но их сочетания позволяют выделить категории пациентов с разной вероятностью успеха биопсии яичка.

2. Методы биопсии яичка обладают высокой и средней эффективностью в плане ЧПС у пациентов с ОА и НОА соответственно; при условии успешного получения сперматозоидов ЧРД существенно не зависит ни от одного андрологического фактора, включая использованный метод биопсии.

3. Открытая микродиссекционная биопсия яичек и их придатка является безопасной процедурой с минимальным профилем ранних и поздних осложнений.

4. Предпочтительным методом получения сперматозоидов при НОА является microTESE; при ОА у пациентов с различной этиологией наилучшие результаты обеспечивает

MESA, тогда как при ОА у других категорий пациентов допустимы пункционные методы биопсии.

5. После неудачных попыток хирургического получения сперматозоидов допустимы повторные попытки микрохирургической биопсии яичка после соответствующей подготовки пациента с учётом данных гистологического исследования.

Степень достоверности и апробация работы

Применение современных методов статистической обработки данных дают основание считать полученные в ходе исследования результаты и сформулированные на их основании выводы обоснованными. Высокая степень достоверности и обоснованности полученных выводов, основных научных положений диссертации достигнута оценкой большого объема клинического материала включающая в себя 754 пациента. Степень достоверности полученных результатов исследований определяется достаточным объемом выборок исследований и использованием новейших методов обследования. Научные положения, выводы и рекомендации, подкреплены убедительными фактическими данными, наглядно представленным в приведённых таблицах.

Материалы и основные положения диссертации доложены и обсуждены на следующих научно-практических конференциях: XXVIII международная конференция Российской ассоциации репродукции человека "Репродуктивные технологии сегодня и завтра" (2018 год, г. Уфа), V Конгресс Ассоциации молодых урологов России «Будущее урологии» (15-16 ноября 2018 года, г. Москва), XXIX международная конференция Российской ассоциации репродукции человека "Репродуктивные технологии сегодня и завтра" (4-7 сентября 2019 года, г. Ростов-на-Дону), международная конференция «Фундаментальная и практическая андрология» (7-11 сентября 2019 года, г. Таллин, Эстония), XIX Конгресс Российского общества урологов (19-21 сентября 2019 года, г. Ростов-на-Дону), XX Юбилейный Всероссийский научно-образовательный форум «Мать и Дитя» (25-27 сентября 2019 года, г. Москва), XIV Международный конгресс по репродуктивной медицине (21-24 января 2020 года, г. Москва), межклиническая научная конференция ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» (21 мая 2021 года, г. Москва), II Евразийский конгресс урологов (16-18 марта 2023 года, г. Уфа), заседание апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» (5 июня 2023 года, г. Москва).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в практическую работу отделения андрологии и урологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России.

Личный вклад автора

Автору принадлежит главная роль в определении тематики и методологии исследования, формулировке его цели и задач, сборе и статистической обработке клинического материала, интерпретации полученных результатов. Автор лично участвовал в процедурах хирургического получения сперматозоидов, а также осуществлял наблюдение за пациентами в послеоперационном периоде.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, отражающие основные результаты диссертации, из них 5 статей в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/Перечень ВАК при Минобрнауки России и 3 статьи, включенных в международную базу цитирования Scopus.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.1.13 – Урология и андрология. Область исследования диссертации соответствует пункту №1 (исследования по изучению этиологии, патогенеза и распространенности урологических и андрологических заболеваний, в т.ч. бесплодия) и пункту №2 (разработка и усовершенствование методов диагностики и профилактики урологических и андрологических заболеваний).

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста, состоит из введения, четырёх глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, содержащего 44 российских источников и 178 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 12 рисунками, 13 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. При проведении исследования использовалась база данных пациентов с азооспермией из бесплодных пар, подвергшихся по крайней мере одной попытке хирургического получения сперматозоидов в НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова. В базу данных вошло 754 пациента (сплошная выборка). Регистрировались и оценивались такие параметры, как возраст пациентов, возраст и состояние здоровья супруги, длительность периода бесплодия, наличие сопутствующих заболеваний, наличие варикоцеле, воздействие неблагоприятных внешних факторов, перенесённые операции, генетические, гормональные, ультрасонографические и гистологические параметры. Этим пациентам было выполнено суммарно 813 попыток хирургического получения сперматозоидов; 55 пациентам выполнено 2 биопсии яичка, 4 пациентам произведено по 3 попытки получения сперматозоидов.

У 216 пациентов (28.6%) исходя из дооперационных клинических данных была диагностирована ОА, а у 525 пациентов была диагностирована НОА (69.6%). Окончательно форму азооспермии устанавливали при получении результатов гистологического исследования. Алгоритм выполнения попытки хирургического получения сперматозоидов продемонстрирован на Рисунке 1.

При оценке репродуктивных изучались частота получения сперматозоидов (ЧПС) и частота рождения детей (ЧРД). Данные показатели подсчитаны как для всей нашей выборки, так и для пациентов с ОА и НОА по отдельности. Для пар, в которых мужчине проводилось 2 или 3 попытки хирургического получения сперматозоидов, определены ЧПС и ЧРД для повторных попыток с учётом гистологического заключения, полученного после первой биопсии.

Сравнивались ЧПС, ЧРД и количество циклов ICSI, потребовавшихся для рождения ребёнка, у пациентов с варикоцеле и без варикоцеле, а также у тех, кто когда-то уже подвергся хирургическому лечению варикоцеле. Оценка статистической значимости проводилась с помощью критерия хи-квадрат Пирсона.

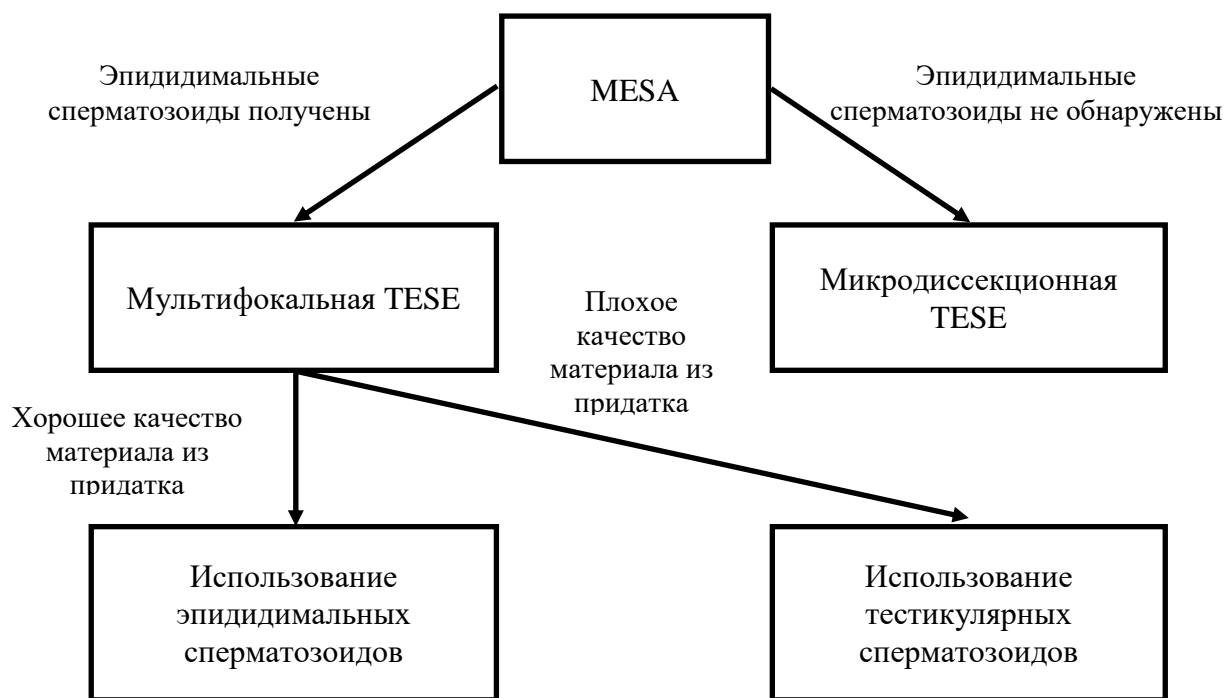


Рисунок 1 – Алгоритм стандартной попытки хирургического получения сперматозоидов

Для определения предикторов успеха попытки хирургического получения сперматозоидов использовался логистический регрессионный анализ, в который вошли следующие переменные: возраст пациента, номер попытки биопсии, длительность вынужденного бесплодия, уровни половых гормонов (тестостерон, эстрадиол, ЛГ, ФСГ, пролактин, ингибин В), суммарный объём яичек по данным ультразвукового исследования органов мошонки, наличие синдрома Кляйнфельтера, наличие хромосомных аномалий, наличие

делеций в регионе AZF Y-хромосомы, наличие мутаций гена муковисцидоза (CFTR), наличие варикоцеле (одностороннего или двустороннего), наличие химиотерапии или лучевой терапии в анамнезе, наличие сахарного диабета, злоупотребление алкоголем, табакокурение, регулярное нарушение теплового режима (горячие ванны, посещение бани или сауны), перенесённые оперативные вмешательства в пахово-мошоночной области (варикоцелэктомия, гидроцелэктомия, грыжесечение, орхипексия).

Отдельная модель логистической регрессии для рождения ребёнка в результате ICSI включала дополнительно вид азооспермии, наличие гинекологической патологии и возраст женщины.

Оценивалась статистическая значимость модели логистической регрессии в целом, значимость входящих в неё переменных и отношение вероятностей (ОВ) успешного получения сперматозоидов с 95%-ным доверительным интервалом (95% ДИ) для каждого фактора, подтвердившего свою значимость.

Проводился анализ с построением дерева классификации (дерево принятия решений) по методу хи-квадрат для выделения категорий пациентов с разной вероятностью успешного получения сперматозоидов.

Проведён анализ рабочей характеристики приёмника (ROC-анализ) для оценки количественных переменных как потенциальных маркеров результата биопсии яичка.

У пациентов с ОА, у которых получалось в достаточном количестве за одну процедуру получить эпидидимальные и тестикулярные сперматозоиды, проводился анализ на индекс фрагментации ДНК, который является суррогатным маркером результата ВРТ и успешного вынашивания беременности. Фрагментация ДНК сперматозоидов определялась с помощью метода TUNEL. Этот параметр сравнивался у сперматозоидов из яичка и его придатка.

После получения результатов морфологического исследования окончательно определялся вид азооспермии (ОА / НОА). У части пациентов на основании клинических данных исходно неверно диагностировалась ОА, тогда как гистологическое исследование идентифицировало выраженные признаки нарушения сперматогенеза, характерные для НОА (гипосперматогенез, остановка сперматогенеза, синдром клеток Сертоли). Для поиска причин ошибочной классификации азооспермии была построена отдельная модель логистической регрессии.

Результаты исследования. Сперматозоиды приемлемого качества были получены в количестве, достаточном для криоконсервации или использования в протоколе ICSI, в 289 случаях из 707; таким образом, общая ЧПС составила 40.9%. После учёта результатов гистологического исследования для окончательного определения вида азооспермии ЧПС при НОА составила 31.1% (188 из 605 попыток), ЧПС при ОА составила 100% (все 96 попыток). При

эякуляторной дисфункции были успешными 5 из 6 попыток хирургического получения сперматозоидов.

Нами был проведён логистический регрессионный анализ для выявления факторов, которые могут повлиять на вероятность успешного получения сперматозоидов у пациентов с азооспермией. Результаты анализа представлены в таблице 1. Уровень ФСГ (ОВ = 0.966; 95% ДИ = 0.940–0.992), уровень тестостерона (ОВ = 0.965; 95% ДИ = 0.936–0.995) и мутации AZFc (ОВ = 0.305; 95% ДИ = 0.094–0.983) были негативно связаны с вероятностью получения сперматозоидов. Значимыми положительными предикторами оказались уровень ингибина В (ОВ = 1.011; 95% ДИ = 1.007–1.015), объём яичек (ОВ = 1.100; 95% ДИ = 1.068–1.132) и орхипексия, выполненная в детстве по поводу крипторхизма (ОВ = 2.979; 95% ДИ = 1.209–7.335).

Ориентируясь на наиболее значимые маркеры успешного получения сперматозоидов при биопсии яичка удалось построить древо принятия решений для выделения категорий пациентов с различной вероятностью благоприятного результата. Наилучшие результаты попыток хирургического получения сперматозоидов наблюдались в группе пациентов с уровнем ингибина В более 89 пг/мл и суммарным объёмом яичек более 22.7 см³ – в этой категории ЧПС составила 87%. Минимальная ЧПС наблюдалась у пациентов с уровнем ингибина В менее 68 пг/мл и ФСГ в диапазоне от 15.1 до 19.7 мМЕ/мл. В этой группе сперматозоиды не были получены ни в одном случае из нашей выборки. При уровне ингибина В менее 68 пг/мл и более высоком уровне ФСГ (> 19.7 мМЕ/мл) процедуры хирургического получения сперматозоидов были более результативными (ЧПС 12%). Древо принятия решений в отношении получения сперматозоидов продемонстрировано на Рисунке 2.

Таблица 1 – Результаты регрессионного анализа факторов, влияющих на ЧПС

<i>Предикторы получения сперматозоидов</i>	<i>ОВ</i>	<i>95% ДИ</i>	<i>p</i>
Возраст (на 1 год)	1.023	0.990–1.057	0.178
Длительность бесплодия в браке	0.801	0.550–1.167	0.248
Номер попытки получения сперматозоидов	1.969	0.956–4.056	0.066
Варикоцеле	0.765	0.483–1.210	0.252
Сахарный диабет	2.537	0.420–15.330	0.311
Нарушения температурного режима	1.020	0.668–1.558	0.926

Продолжение Таблицы 1

Табакокурение	1.481	0.935–2.348	0.094
Злоупотребление алкоголем	1.176	0.569–2.430	0.662
Синдром Кляйнфельтера	0.582	0.117–2.892	0.492
Хромосомные аномалии	0.292	0.041–2.071	0.218
Мутации CFTR	1.779	0.328–9.652	0.505
Мутации AZFc	0.305	0.094–0.983	0.047
Уровень ингибина В (на 1 пг/мл)	1.011	1.007–1.015	< 0.001
Уровень ФСГ (на 1 мМЕ/мл)	0.966	0.940–0.992	0.011
Уровень ЛГ (на 1 мМЕ/мл)	1.021	0.993–1.050	0.149
Уровень тестостерона (на 1 нмоль/л)	0.965	0.936–0.995	0.022
Уровень прогестерона (на 1 нмоль/л)	1.035	0.845–1.266	0.741
Уровень пролактина (на 1 мкМЕ/мл)	0.999	0.998–1.001	0.385
Уровень эстрадиола (на 1 пмоль/л)	0.999	0.995–1.002	0.556
Суммарный объём яичек (на 1 см ³)	1.100	1.068–1.132	< 0.001
Варикоцелэктомия в анамнезе	0.680	0.357–1.295	0.241
Гидроцелэктомия в анамнезе	1.546	0.746–3.206	0.957
Орхипексия в анамнезе	2.979	1.209–7.335	0.018
Паховое грыжесечение в анамнезе	0.555	0.255–1.209	0.917
Травма мошонки в анамнезе	1.380	0.627–3.037	0.424

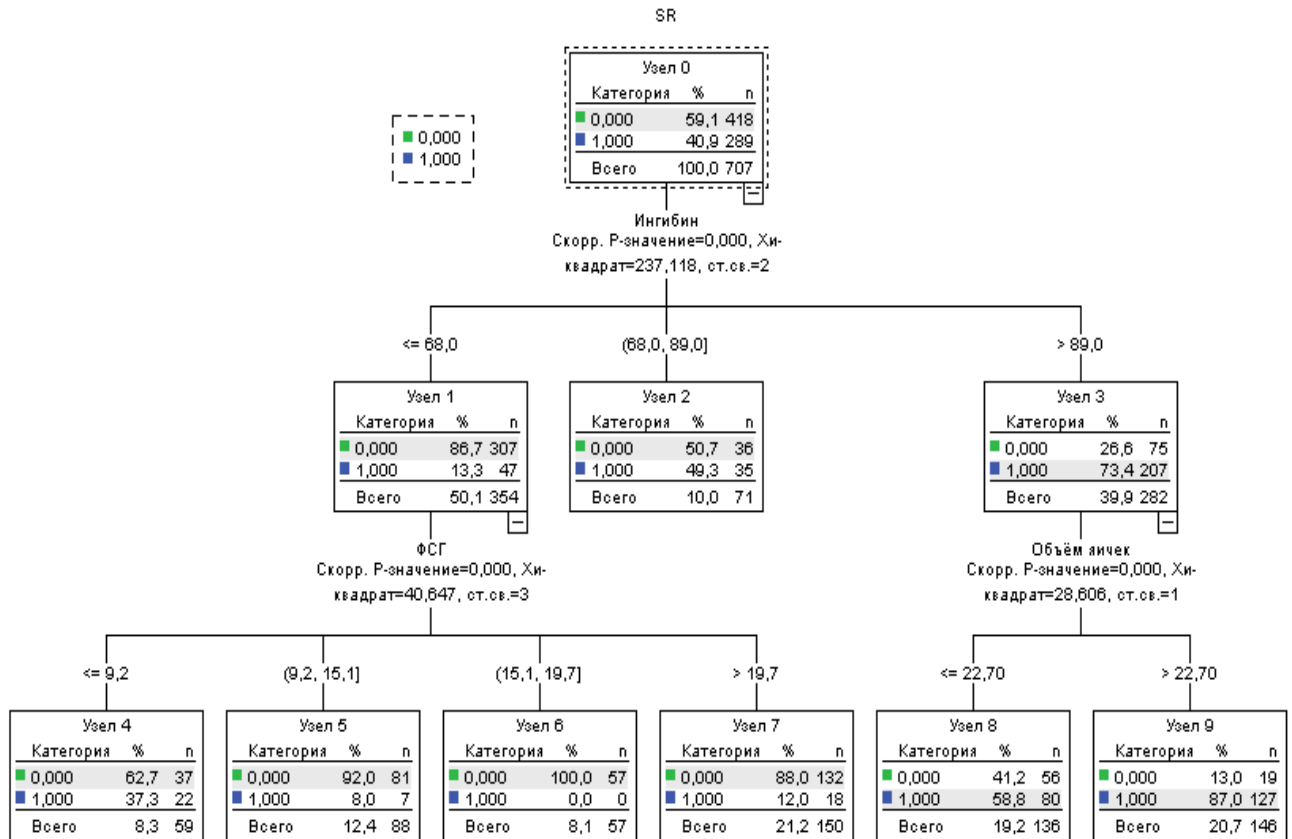


Рисунок 2 – Древо классификации для определения групп пациентов с разной ЧПС

Частота рождения детей в нашей выборке составила 17.5% в пересчёте на попытки получения сперматозоидов. У 18.9% пациентов с азооспермией за период наблюдения удалось добиться рождения ребёнка. Реальная частота рождения детей может оказаться выше, учитывая то, что криоконсервированные сперматозоиды могут быть использованы для повторных попыток ICSI в будущем. При НОА показатель ЧРД составил 12.9%, а при ОА – 45.8%, что примерно соответствует частоте успеха ВРТ в стандартных условиях. Однако, при подсчёте только в тех парах, где сперматозоиды были успешно получены при биопсии яичка, ЧРД была практически одинаковой при ОА и НОА, составляя 48.9% и 48.1% соответственно. Результаты регрессионного анализа показаны в Таблице 2. Значимыми негативными предикторами рождения ребёнка при ICSI с использованием полученных хирургическим путём сперматозоидов были возраст женщины (ОВ = 0.909; 95% ДИ = 0.840–0.983) и наличие гинекологических заболеваний (ОВ = 0.362; 95% ДИ = 0.149–0.882).

Таблица 2 – Результаты регрессионного анализа факторов, влияющих на ЧРД

<i>Предикторы рождения ребёнка</i>	<i>ОВ</i>	<i>95% ДИ</i>	<i>p</i>
Возраст мужчины (на 1 год)	1.050	0.992–1.111	0.090
Возраст женщины (на 1 год)	0.909	0.840–0.983	0.017
Обструктивная азооспермия	2.920	0.278–30.643	0.372
Необструктивная азооспермия	1.985	0.201–19.588	0.557
Наличие гинекологических заболеваний	0.362	0.149–0.882	0.025
Длительность бесплодия в браке	0.734	0.447–1.207	0.223
Варикоцеле	1.496	0.770–2.907	0.235
Нарушения температурного режима	1.469	0.852–2.532	0.167
Табакокурение	0.679	0.362–1.274	0.228
Злоупотребление алкоголем	0.561	0.222–1.418	0.222
Синдром Кляйнфельтера	1.201	0.054–26.919	0.908
Хромосомные аномалии	0.520	0.024–11.400	0.678
Мутации CFTR	2.290	0.457–11.473	0.314
Мутации AZFc	0.000	0.000–>9999	0.999
Уровень ингибина В (на 1 пг/мл)	1.001	0.996–1.006	0.704
Уровень ФСГ (на 1 мМЕ/мл)	1.005	0.957–1.055	0.853
Уровень ЛГ (на 1 мМЕ/мл)	1.000	0.948–1.054	0.994
Уровень тестостерона (на 1 нмоль/л)	0.981	0.937–1.027	0.420
Уровень прогестерона (на 1 нмоль/л)	0.824	0.618–1.100	0.189
Уровень пролактина (на 1 мкМЕ/мл)	1.000	0.998–1.002	0.898
Уровень эстрадиола (на 1 пмоль/л)	1.003	0.997–1.009	0.297
Суммарный объём яичек (на 1 см ³)	1.027	0.991–1.064	0.137
Варикоцелэктомия в анамнезе	0.801	0.315–2.036	0.640
Орхипексия в анамнезе	1.609	0.430–6.024	0.480
Химиолучевая терапия в анамнезе	1.533	0.079–29.745	0.778

На Рисунке 3 продемонстрирована частота преобладающих гистологических паттернов в тестикулярной паренхиме у мужчин с НОА. Часто различные гистологические находки сочетались у одного и того же пациента, однако в диаграмме представлены данные именно по преобладающей картине (гистологическому заключению): в 142 случаях это был гипосперматогенез, в 156 случаях – остановка сперматогенеза, в 237 случаях – СКС. В 262 случаях наблюдались дополнительно атрофические изменения канальцев, в 17 случаях – склерогиалиноз.



Рисунок 3 – Гистологическая картина тестикулярной паренхимы у пациентов с НОА

Был проведён анализ результатов microTESE при феномене изолированного повышения ФСГ, когда уровень ЛГ находился в пределах референсных значений. Было идентифицировано 145 таких пациентов. Сперматозоиды были получены у 17 из них. Таким образом, ЧПС у них была критически низкой и составила 11.7%. ЧРД в парах, к которым принадлежали эти пациенты, составила 4.8%. Добавление логической переменной, отражающей наличие изолированного повышения уровня ФСГ, в модель логистической регрессии для определения успеха попыток хирургического получения сперматозоидов, продемонстрировало, что этот феномен является независимым отрицательным предиктором (ОВ = 0.274; 95% ДИ = 0.148–0.506; $p < 0.001$). Любопытно, что при этом номинальный уровень ФСГ потерял статус самостоятельного предиктора результата биопсии яичка ($p = 0.084$).

Результаты гистологического исследования тестикулярной паренхимы пациентов с изолированным повышением уровня ФСГ представлены на Рисунке 4. Преобладающим

паттерном был СКС (n = 108, 74.5%). В 92 случаях это был тотальный СКС или полная атрофия канальцев, а в 1 случае наблюдалась «чистая» остановка сперматогенеза на этапе круглых сперматид. В 35 случаях сочетались признаки СКС и нарушения созревания половых клеток без более продвинутых этапов спермиогенеза. В оставшихся 17 случаях (11.7%) хотя бы 1% семенных канальцев содержали вытянутые сперматиды, а при microTESE были обнаружены сперматозоиды. В одном случае, как ни странно, индекс Бергманна-Клиш был равен 8; наблюдалось три случая смешанной тестикулярной атрофии со значениями индекса 4, 4 и 1 соответственно. В оставшихся случаях он находился в диапазоне от 0.1 до 0.8.



Рисунок 4 – Гистологическая картина тестикулярной паренхимы у пациентов с изолированным повышением уровня ФСГ

У 216 пациентов на основании первичных данных физикальных, ультразвуковых и лабораторных методов исследования был установлен диагноз «обструктивная азооспермия». У всех этих пациентов был нормальный объём яичек, нормальный уровень половых гормонов и отсутствовали указания на очевидные анамнестические факторы, способные вызвать НОА. У 131 пациента (60.6%) отмечалось расхождение первичного клинического диагноза с патогистологическими данными. Построена модель логистической регрессии для определения факторов, которые позволили бы заподозрить НОА у пациентов с нормальными клинико-лабораторными параметрами. Единственным значимым фактором в модели оказалось регулярное нарушение температурного режима органов мошонки – ОВ для неверного определения характера азооспермии у пациентов с этим фактором составило 1.989 (95% ДИ =

1.101–3.595). Анализ с помощью дерева решений показал, что вероятность ошибочного определения вида азооспермии была максимальной (82.6%) в категории пациентов с уровнем ингибина В ниже 93 пг/мл (Рисунок 5).

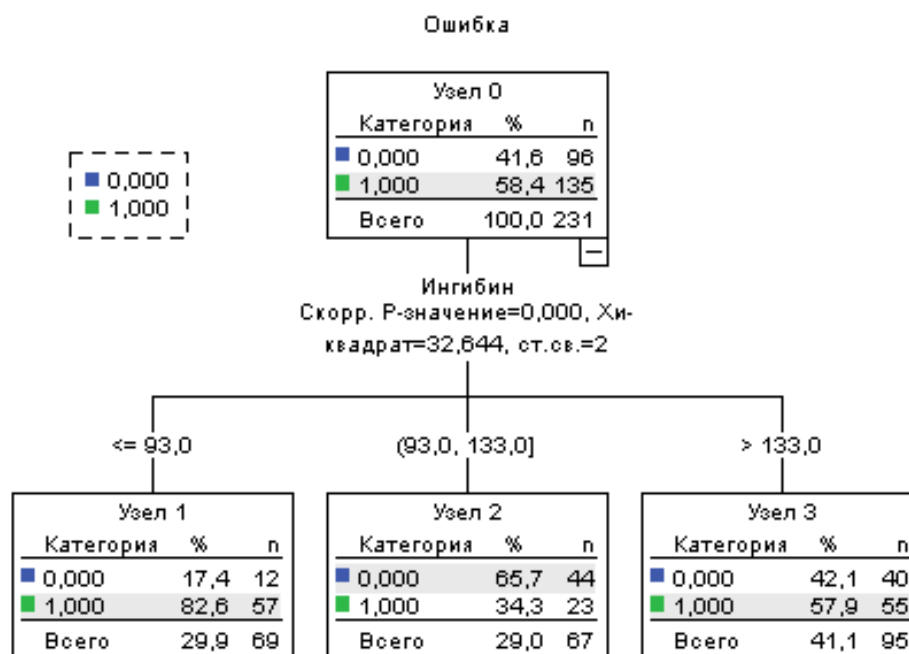


Рисунок 5 – Дерево классификации для определения групп пациентов, у которых возможно ошибочное определение вида азооспермии

Для оценки качества сперматозоидов у пациентов с ОА мы применяли анализ на фрагментацию ДНК (методика TUNEL). Лишь у 45 пациентов было получено достаточно материала как из яичка, так и из его придатка, чтобы можно было провести адекватный сравнительный анализ по индексу фрагментации ДНК сперматозоидов. Медиана индекса фрагментации ДНК эпидидимальных сперматозоидов составила 28.5% (диапазон: 18.1–46.5; МКР: 26.1–32.7), тестикулярных сперматозоидов – 15.9% (диапазон: 7.6–22.6; МКР: 13.5–20.1). Разница оказалась статистически значимой ($p = 0.0004$).

ЧПС у пациентов с синдромом Кляйнфельтера 47,XXY оказалась в нашей выборке низкой – сперматозоиды были получены в 2 случаях из 27 (7.4%). У одного пациента родился здоровый ребёнок после ICSI с преимплантационной генетической диагностикой. При наличии мутаций CFTR сперматозоиды были получены у 10 из 13 пациентов (76.9%). У всех трёх пациентов с неудачами биопсии яичка при мутациях CFTR был гипергонадотропный гипогонадизм, что свидетельствовало о нарушенном сперматогенезе; у одного из них мутации CFTR сопутствовали делеции региона AZFb, ещё у одного – делеции региона AZFc. Из 17 пациентов с

изолированными хромосомными аномалиями без каких-либо других генетических нарушений сперматозоиды были получены лишь у двоих (11.7%), и в одной из пар удалось добиться рождения ребёнка в результате ICSI. У пациентов с мутациями AZFc (без поражения регионов AZFa и AZFb) удалось получить сперматозоиды в 5 случаях из 31 (16.1%), хотя ни в одной паре на момент выполнения анализа не удалось добиться рождения ребёнка.

Проведён логистический регрессионный анализ факторов, которые могли бы указывать на вероятное наличие генетических причин бесплодия у мужчин с азооспермией. Отрицательными предикторами наличия генетических нарушений у мужчин с азооспермией являются возраст (ОВ = 0.884; 95% ДИ = 0.843–0.928), уровень ЛГ (ОВ = 0.967; 95% ДИ = 0.941–0.994), уровень эстрадиола (ОВ = 0.992; 95% ДИ = 0.988–0.997), а положительными предикторами являются уровень ФСГ (ОВ = 1.031; 95% ДИ = 1.009–1.054) и уровень пролактина (ОВ = 1.001; 95% ДИ = 1.000–1.003).

Для оценки влияния варикоцеле на репродуктивные исходы были сопоставлены ЧПС, ЧРД и количество циклов ICSI, потребовавшихся для рождения ребёнка, у пациентов с подтверждённым варикоцеле на момент выполнения биопсии яичка и у пациентов без варикоцеле (Таблица 3). Всего в выборке было 203 пациента с варикоцеле (группа 1) и 504 пациента без варикоцеле (группа 2). Попытки ICSI после хирургического получения сперматозоидов проводились в 73 и 186 парах соответственно.

Таблица 3 – Результаты ICSI после попыток хирургического получения сперматозоидов в зависимости от наличия или отсутствия варикоцеле

<i>Репродуктивные результаты</i>	<i>Группа 1</i>	<i>Группа 2</i>	<i>P</i>
Частота получения сперматозоидов	38.9% (n = 79)	41.7% (n = 210)	0.5
Частота рождения детей	52% (n = 38)	47% (n = 86)	0.771
Количество циклов на 1 рождение	3 [0]	2 [2]	<0.00001

Чтобы оценить возможное влияние хирургического лечения варикоцеле на репродуктивные результаты, проведено сравнение пациентов с варикоцеле (группа 1, n = 203) и пациентов, которым ранее была выполнена варикоцелэктомия (группа 2, n = 89). Результаты сравнения представлены в Таблице 4.

Таблица 4 – Результаты ICSI после попыток хирургического получения сперматозоидов у пациентов с варикоцеле и пациентов, перенесших варикоцелэктомия

<i>Репродуктивные результаты</i>	<i>Группа 1</i>	<i>Группа 2</i>	<i>P</i>
Частота получения сперматозоидов	38.9% (n = 79)	38.2% (n = 34)	0.908
Частота рождения детей	52% (n = 38)	46.7% (n = 14)	0.771
Количество циклов на 1 рождение	3 [0]	1 [2]	0.00072

В выборку вошло 59 пациентов, которым выполнялись повторные биопсии яичка. Из них 55 пациентам выполнено 2 попытки хирургического получения сперматозоидов, и ещё 4 пациентам выполнено 3 попытки хирургического получения сперматозоидов. У пациентов с НОА при повторных попытках сперматозоиды были получены в 20 случаях (43.5%). К рождению ребёнка в результате ICSI привели 23.9% повторных биопсий (Таблица 5). Наиболее благоприятные результаты наблюдались у пациентов, у которых при гистологическом исследовании после первой биопсии был подтверждён гипосперматогенез. При остановке созревания сперматозоидов на различных стадиях результаты были несколько хуже, хотя даже при такой гистологической картине удавалось получить сперматозоиды и в единичных случаях добиться рождения детей. Интересно, что при microTESE сперматозоиды было возможно получить даже при СКС по данным первичной биопсии в 4 из 12 случаев, хотя ни разу это не привело к рождению ребёнка.

Таблица 5 – Результаты повторных попыток хирургического получения сперматозоидов при НОА

<i>Первичная гистология</i>	<i>Общее количество</i>	<i>Получение сперматозоидов</i>	<i>Рождение детей</i>
Гипосперматогенез	24	16 (66.7%)	9 (37.5%)
Остановка созревания на этапе вытянутых сперматид	5	2 (40%)	1 (20%)
Остановка созревания на этапе круглых сперматид	5	2 (40%)	1 (20%)
Сертоликлеточный синдром	12	4 (33.3%)	0
<i>Всего</i>	46	24 (52.2%)	11 (23.9%)

ВЫВОДЫ

1. Значимыми негативными предикторами успеха биопсии яичка являются уровень ФСГ (ОВ = 0.966; 95% ДИ = 0.940–0.992), уровень тестостерона (ОВ = 0.965; 95% ДИ = 0.936–0.995) и мутации AZFc (ОВ = 0.305; 95% ДИ = 0.094–0.983), а положительными предикторами являются уровень ингибина В (ОВ = 1.011; 95% ДИ = 1.007–1.015), объём яичек (ОВ = 1.100; 95% ДИ = 1.068–1.132) и выполненная в детском возрасте по поводу крипторхизма орхипексия (ОВ = 2.979; 95% ДИ = 1.209–7.335), причём этиология необструктивной азооспермии практически не влияет на вероятность успеха хирургического получения сперматозоидов ($p > 0.05$ для всех рассмотренных этиологических факторов кроме мутаций AZFc); наименьшая вероятность получения сперматозоидов наблюдается у пациентов с уровнем ингибина В менее 68 пг/мл и уровнем ФСГ в диапазоне 15.1–19.7 мМЕ/мл.
2. Успешное получение сперматозоидов при выполнении процедуры PESA / TESA наиболее вероятно у пациентов с большим уровнем ингибина В в сыворотке крови (ОВ = 1.026; 95% ДИ = 1.011–1.041) и объёмом яичек (ОВ = 1.113; 95% ДИ = 1.026–1.207), однако даже при тщательном отборе пациентов по клиническим и лабораторным показателям пункционные методы оказались эффективными лишь в 72.4% случаев, а пациентам с острым эпидидимитом и операциями на придатках яичек в анамнезе требовалось выполнять конверсию в открытую микрохирургическую биопсию.
3. Ни один из андрологических факторов не был статистически значимым предиктором рождения ребёнка в результате ICSI с использованием полученных хирургическим путём сперматозоидов ($p > 0.05$ для всех рассмотренных факторов), важными негативными предикторами оказались только возраст женщины (ОВ = 0.909; 95% ДИ = 0.840–0.983) и наличие у неё гинекологической патологии (ОВ = 0.362; 95% ДИ = 0.149–0.882).
4. Единственным фактором, указывающим на вероятное наличие НОА у пациентов с нормальным гормональным профилем и объёмом яичек, является регулярное нарушение температурного режима с перегревом органов мошонки в анамнезе (ОВ = 1.989; 95% ДИ = 1.101–3.595); ошибочное определение вида азооспермии наиболее вероятно при уровне ингибина В менее 93 пг/мл.
5. У пациентов с истинной ОА тестикулярные сперматозоиды характеризуются значительно меньшим индексом фрагментации ДНК по сравнению с эпидидимальными (15.9% против 28.5%; $p = 0.0004$).
6. Отрицательными предикторами наличия генетических нарушений у мужчин с азооспермией являются возраст (ОВ = 0.884; 95% ДИ = 0.843–0.928), уровень ЛГ (ОВ = 0.967; 95% ДИ = 0.941–0.994), уровень эстрадиола (ОВ = 0.992; 95% ДИ = 0.988–0.997), а

положительными предикторами являются уровень ФСГ (ОВ = 1.031; 95% ДИ = 1.009–1.054) и уровень пролактина (ОВ = 1.001; 95% ДИ = 1.000–1.003); вероятность наличия генетических причин азооспермии составляет менее 10% в возрасте до 30 лет при уровне ФСГ менее 5.5 мМЕ/мл, в возрасте 30–39 лет при уровне ФСГ менее 19.7 мМЕ/мл и в возрасте от 39 лет при любом уровне ФСГ.

7. Наличие варикоцеле на момент выполнения биопсии яичка практически не влияет на частоту получения сперматозоидов (38.9% против 41.7%, $p = 0.5$) и частоту рождения детей (19.3% против 18%, $p = 0.147$), но увеличивает число циклов ICSI, требующихся для рождения одного ребёнка (медиана: 3 против 2, $p < 0.00001$); в парах, где мужчине ранее выполнялась варикоцелэктомия, этот показатель был ниже, чем в парах, где у мужчины было варикоцеле на момент выполнения биопсии яичка (медиана: 1 против 3; $p = 0.00072$) вне зависимости от вида операции.

8. Сперматозоиды удалось обнаружить у 27 из 31 пациентов (87%) с гипосперматогенезом, у 5 из 8 (62.5%) пациентов с остановкой сперматогенеза и у 4 из 12 (33.3%) пациентов с сертоликлеточным синдромом в первичной биопсии, хотя ни один из гистологических паттернов не оказался статистически значимым прогностическим фактором в отношении результата повторной биопсии яичка ($p > 0.05$ для всех).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При консультировании бесплодных пар следует учитывать, что шансы на успех при попытках хирургического получения сперматозоидов есть у всех категорий пациентов независимо от этиологии азооспермии, за исключением тех случаев, когда обнаружены мутации регионов AZFa и AZFb Y-хромосомы и очевидные анатомические факторы, делающие биопсию яичка невозможной.

2. Пункционные методы хирургического получения сперматозоидов следует выполнять у тщательно отобранной категории пациентов с высоким уровнем ингибина В и нормальным объёмом яичек в условиях, позволяющих выполнить конверсию в открытую биопсию (MESA, TESE, microTESE).

3. При определении стратегии ведения бесплодной пары с азооспермией следует учитывать, что в случае успешного получения сперматозоидов вероятность рождения ребёнка после проведения процедуры ICSI зависит преимущественно от гинекологических факторов и возраста женщины.

4. У пациентов с азооспермией, имеющих уровень ингибина В менее 93 пг/мл, постоянно подвергающихся нарушениям температурного режима с перегревом органов мошонки, а также у

пациентов без явных факторов риска развития обструкции семенных путей следует подозревать НОА и начинать попытки хирургического получения сперматозоидов с открытых методик даже при нормальном объёме яичек и отсутствии изменений гормонального профиля.

5. Учитывая значительно меньший индекс фрагментации ДНК у сперматозоидов, полученных из яичка, во время процедур хирургического получения сперматозоидов у пациентов с обструктивной азооспермией всегда следует пытаться получить тестикулярные сперматозоиды, не ограничиваясь аспирацией содержимого придатков яичек.

6. Пациенты старше 39 лет с азооспермией без соматических проявлений, характерных для генетических аномалий, и без изолированного повышения уровня ФСГ на фоне нормального уровня ЛГ в большинстве случаев не нуждаются в кариотипировании и анализе на мутации AZF-фактора.

7. Для повышения качества сперматозоидов и сокращения количества циклов ICSI, которые потребуются для рождения ребёнка, пациентам с азооспермией и варикоцеле следует выполнять варикоцелэктомию перед попытками хирургического получения сперматозоидов.

8. Пациентам не следует отказывать в выполнении повторной биопсии яичка, основываясь на результатах первичного гистологического исследования.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Варикоцеле и необструктивная азооспермия – с чего начать? / А.Ю. Попова, С.И. Гамидов, Р.И. Овчинников, Н.П. Наумов, **Н.Г. Гасанов** // **Андрология и генитальная хирургия.** – 2017. – Т. 18, №4. – С. 77-80.
2. Роль методов хирургического получения сперматозоидов у пациентов с азооспермией в программах вспомогательных репродуктивных технологий (обзор литературы) / С.И. Гамидов, А.Ю. Попова, **Н.Г. Гасанов**, Р.И. Овчинников, Н.П. Наумов, Т.В. Шатылко // **Андрология и генитальная хирургия.** – 2018. – Т. 19, №3. – С. 27-34.
3. Репродуктивный потенциал сперматозоидов, полученных хирургическим путем у пациентов с азооспермией / **Н.Г. Гасанов**, С.И. Гамидов, Т.В. Шатылко, А.Ю. Попова, О.Б. Лоран, Н.П. Макарова, И.В. Ушакова // **Экспериментальная и клиническая урология.** - 2019. – №3. – С. 126-132.
4. Роль пункционной биопсии яичка в ведении пациентов с азооспермией / **Н.Г. Гасанов**, С.И. Гамидов, Т.В. Шатылко, А.Ю. Попова, Н.П. Макарова, И.В. Ушакова, О.Б. Лоран // **Исследования и практика в медицине.** – 2020. – Т. 7, №3. – С. 43-50.

5. Прогностические возможности протеомного анализа семенной плазмы у мужчин с азооспермией / А.Г. Бржозовский, Н.Л. Стародубцева, А.Е. Бугрова, А.С. Кононихин, В.В. Чаговец, Т.В. Шатылко, С.И. Гамидов, А.Х. Тамбиев, А.Ю. Попова, **Н.Г. Гасанов**, Т.Б. Бицоев, В.Е. Франкевич // **Андрология и генитальная хирургия.** – 2021. – Т. 22, №3. – С. 18-24. [Scopus]
6. Azoospermic men with isolated elevation of folliclestimulating hormone represent a specific subpopulation of patients with poor reproductive outcomes / S. Gamidov, T. Shatytko, A. Popova, **N. Gasanov**, G. Sukhikh // **Clinical and Experimental Reproductive Medicine.** – 2022. – Vol. 49, №1. – P. 62-69.[Web of Science, PubMed, Scopus]
7. Трудности в дифференциальной диагностике обструктивной и необструктивной азооспермии / С.И. Гамидов, Т.В. Шатылко, А.Х. Тамбиев, **Н.Г. Гасанов**, А.Ю. Попова, А.А.А. Альравашдех // **Вестник урологии.** – 2022. – Т. 10, №2. – С. 19-31.
8. Изолированное повышение уровня фолликулостимулирующего гормона как прогностический фактор негативного результата microTESE / С.И. Гамидов, Т.В. Шатылко, А.Ю. Попова, **Н.Г. Гасанов**, Н.К. Дружинина // **Андрология и генитальная хирургия.** – 2023. – Т. 24, №2. – С. 85-94. [Scopus]

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВРТ - вспомогательные репродуктивные технологии

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ЛГ- лютеинизирующий гормон

НОА - необструктивная азооспермия

ОА - обструктивная азооспермия

СКС- синдром клеток Сертоли

ФСГ- фолликулостимулирующий гормон

ЧПС- частота получения сперматозоидов

ЧРД - частота рождения детей

AZF - azoospermia factor (фактор азооспермии)

CFTR - cystic fibrosis transmembrane regulator (трансмембранный регулятор муковисцидоза)

ICSI - intracytoplasmic sperm injection (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в цитоплазму яйцеклетки)

MESA - microsurgical epididymal sperm aspiration (микрохирургическая аспирация сперматозоидов из придатка яичка)

microTESE - microdissection testicular sperm extraction (микродиссекционная экстракция сперматозоидов из яичка)

PESA - percutaneous epididymal sperm aspiration (чрезкожная аспирация сперматозоидов из придатка яичка)

ROC- receiver operating characteristic (рабочая характеристика приёмника)

TESA - testicular sperm aspiration (аспирация сперматозоидов из яичка)

TESE - testicular sperm extraction (экстракция сперматозоидов из яичка)

TUNEL - terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (метод TdT-опосредованной метки dUTP-конца разрыва цепи ДНК)