

Анализ потенциала фертильности мужчин с азооспермией и олигозооспермией тяжелой степени различной этиологии

Т.А. Яманди¹, Л.В. Акуленко¹, Н.Ю. Сафина¹, И.И. Витязева², С.В. Боголюбов², Я.И. Мельник⁵,
Е.В. Касатонова⁵, А.В. Поляков³, М.В. Андреева³, В.Б. Черных^{3,4}

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; Россия, 127473 Москва, ул. Десятская, 20, стр. 1;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России; Россия, 117036 Москва, ул. Дмитрия Ульянова, 11;

³ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1;

⁴ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117437 Москва, ул. Островитянова, 1;

⁵НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; Россия, 105425 Москва, ул. 3-я Парковая, 51, стр. 1

Контакты: Татьяна Анатольевна Яманди tiamandi@yandex.ru

Цель исследования – оценить значение наличия микроделций Y-хромосомы при прогнозировании успешности получения сперматозоидов при биопсии яичка у мужчин с азооспермией и олигозооспермией тяжелой степени.

Материалы и методы. Обследованы 109 мужчин в возрасте от 21 до 56 лет (в среднем $32,7 \pm 0,2$ года) с бесплодием в браке. Для выявления негенетических и генетических причин бесплодия проводили цитогенетическое, специальное андрологическое, спермиологическое и молекулярно-генетическое исследования.

Результаты. Нормальный кариотип и отсутствие делеций в локусе AZF выявлены у 75 мужчин, наличие делеций – у 34. Эти группы были сопоставимы по частоте форм патозооспермии. Сперматозоиды получены при биопсии у 47 (62,7 %) пациентов, не имеющих делеций локуса AZF, и только у 7 (20,6 %) пациентов с делециями. Выделены 2 подгруппы мужчин с делециями локуса AZF – с полными ($n = 25$) и частичными ($n = 9$). Среди мужчин с полными AZF-делециями азооспермия диагностирована у 25 (100 %), сперматозоиды в результате биопсии получены у 2 (8 %); среди мужчин с частичными AZF-делециями у 7 (77,8 %) выявлена азооспермия, у 2 (22,2 %) – олигозооспермия тяжелой степени, сперматозоиды получены у 5 (56 %). Затем пациенты были распределены по другому критерию: 54 пациента, у которых удалось получить сперматозоиды в результате биопсии, и 55 мужчин с отрицательными результатами. Среди пациентов с успешным результатом биопсии микроделеции Y-хромосомы обнаружены у 7 (13 %), а среди пациентов с отрицательным результатом – у 27 (49 %) ($p < 0,01$).

Заключение. Частота получения сперматозоидов при биопсии яичка у мужчин без делеций локуса AZF статистически значимо ($p < 0,01$) выше, чем у мужчин с делециями. Молекулярно-генетическое исследование на наличие микроделций Y-хромосомы следует рекомендовать мужчинам с азооспермией и олигозооспермией тяжелой степени, поскольку оно позволяет диагностировать причину бесплодия и прогнозировать успешность тестискулярной биопсии.

Ключевые слова: биопсия яичек, Y-хромосома, локус AZF, делеции, мужское бесплодие, репродукция человека, хромосомные аномалии, экстракорпоральное оплодотворение, ЭКО/ICSI

Для цитирования: Яманди Т.А., Акуленко Л.В., Сафина Н.Ю. и др. Анализ потенциала фертильности мужчин с азооспермией и олигозооспермией тяжелой степени различной этиологии. Андрология и генитальная хирургия 2018;19(3):60–9.

DOI: 10.17650/2070-9781-2018-19-3-60-69

Analysis of fertility potential in men with severe azoospermia and oligospermia of various etiology

T.A. Yamandi¹, L.V. Akulenko¹, N.Yu. Safina¹, I.I. Vityazeva², S.V. Bogolubov², Ya.I. Melnik⁵,
E.V. Kasatonova⁵, A.V. Polyakov³, M.V. Andreeva³, V.B. Chernykh^{3,4}

¹A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Ministry of Health of Russia; Build. 1, 20 Delegatskaya St., Moscow 127473, Russia;

²National Medical Research Center of Endocrinology, Ministry of Health of Russia; 11 Dmitriya Ul'yanova St., Moscow 117036, Russia;

³Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorech'e St., Moscow 115522, Russia;

⁴N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117437, Russia;

⁵N.A. Lopatkin Scientific Research Institute of Urology and Interventional Radiology – branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; Build. 1, 51 3rd Parkovaya St., Moscow 105425, Russia

The study objective is to evaluate the significance of the Y chromosome microdeletions for prediction of spermatozoa retrieval during testicle biopsy in men with severe azoospermia and oligozoospermia.

Materials and methods. In total, 109 men aged 21 to 56 years (mean age 32.7 ± 0.2 years) with infertility in marriage were examined. Cytogenetic, special andrological, spermiological, and molecular genetic examinations were performed to evaluate non-genetic and genetic causes of infertility.

Results. Normal karyotype and absence of AZF deletions were found in 75 men, presence of deletions – in 34. The frequencies of pathozoospermia forms were comparable in these groups. Spermatozoa were retrieved during biopsy in 47 (62.7 %) patients without Y chromosome microdeletions and only in 7 (20.6 %) patients with Y chromosome microdeletions. The men with AZF deletions were divided into 2 subgroups: men with complete AZF region deletions ($n = 25$) and men with partial AZF deletions ($n = 9$). Among men with complete deletions, azoospermia was diagnosed in 25 (100 %), spermatozoa were retrieved during biopsy in 2 (8 %); among men with partial deletions, azoospermia was diagnosed in 7 (77.8 %), severe oligozoospermia in 2 (22.2 %), spermatozoa were retrieved during biopsy in 5 (56 %). Then the patients were divided according to another criterion: 54 patients from whom spermatozoa were retrieved during biopsy and 55 men with negative results. Among patients with successful result of biopsy, Y chromosome microdeletions were identified in 7 (13 %); among patient with negative biopsy result – in 27 (49 %) ($p < 0.01$).

Conclusion. Success rate of spermatozoa retrieval during testicle biopsy is significantly higher in men without AZF deletions ($p < 0.01$) than in men with deletions. Molecular genetic examination of Y chromosome microdeletions is recommended for men with azoospermia and severe oligozoospermia because it allows diagnosing of cause male infertility and predicting.

Key words: testicular biopsy, Y chromosome, AZF locus, deletions, male infertility, human reproduction, chromosomal anomalies, in vitro fertilization, IVF/ICSI

For citation: Yamandi T.A., Akulenko L.V., Safina N.Yu. et al. Analysis of fertility potential in men with severe azoospermia and oligospermia of various etiology. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2018;19(3):60–9.

Введение

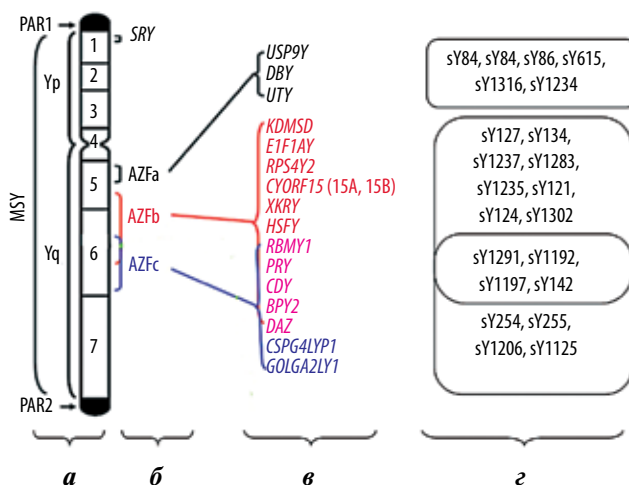
У 5–7 % мужчин выявляют нарушение фертильности, этиологическими факторами которого могут быть генетические и средовые (или их сочетание) [1]. К средовым факторам относят травмы органов мошонки и операции на них, инфекции, облучение, воздействие химических агентов и др. [2, 3]. Наиболее частые генетические причины мужского бесплодия – аномалии кариотипа, в большинстве случаев представленные численными и структурными аномалиями половых хромосом, а также микроделеции длинного плеча Y-хромосомы и мутации в гене *CFTR* [4, 5].

У 10–15 % мужчин с бесплодием диагностируют азооспермию, которая в половине случаев прямо обусловлена генетическими факторами или косвенно связана с их действием [6]. Одни из наиболее распространенных генетических причин нарушения сперматогенеза – синдром Клайнфельтера и клинически значимые делеции локуса AZF Y-хромосомы [7–9].

На длинном плече Y-хромосомы в локусе Yq11.2 выявлен участок, названный AZF (azoospermia factor, «фактор азооспермии»), делеции которого приводят к нарушению сперматогенеза и мужскому бесплодию [10, 11]. По размеру и локализации делеций в локусе AZF картированы 3 региона: AZFa, AZFb и AZFc, каждый из которых содержит гены, контролирующие сперматогенез (см. рисунок) [10]. Микроделеции Y-хромосомы обнаруживают у 8–10 % пациентов с азооспермией и у 4–5 % пациентов с олигозооспермией тяжелой степени [12].

Делеция всего локуса AZF, а также полные делеции региона (ов) AZFa и/или AZFb приводят к наиболее

тяжелым формам нарушения сперматогенеза – синдрому наличия только клеток Сертоли и секреторной азооспермии [14–16]. Наиболее часто микроделеции



Схематичное изображение Y-хромосомы человека: а – регионы Y-хромосомы (Yp – короткое плечо, Yq – длинное плечо, PAR1 и PAR2 – псевдоаутосомные регионы 1 и 2 соответственно; MSY – регион Y-хромосомы, специфичный для мужского пола; сегменты 1–7 – делеционные интервалы; SRY – ген, контролирующий формирование пола по мужскому типу); б – регионы локуса AZF (AZFa, AZFb и AZFc); в – гены, картированные в регионах локуса AZF; г – ДНК-маркеры из соответствующих регионов локуса AZF [13]

Schematic representation of the human Y chromosome: а – Y chromosome regions (Yp – short of Y, Yq – long arm of Y, PAR1 and PAR2 – pseudoautosomal regions 1 and 2, respectively; MSY – male-specific region of the Y chromosome; segments 1–7 – deletion intervals; SRY (gene) – sex-determining region of Y; б – AZF locus regions (AZFa, AZFb, and AZFc); в – genes mapped in AZF regions; г – DNA markers from the respective AZF regions [13]

Y-хромосомы встречаются в регионе AZFc. Формы патозооспермии у мужчин с полными делециями региона AZFc (del b2/b4) варьируют от азооспермии до олигозооспермии [11, 17]. Как правило, при этом концентрация сперматозоидов не превышает 1–2 млн/мл [16, 18]. В отличие от полных, частичные делеции региона AZFc характеризуются различным состоянием фертильности, при этом сперматогенез варьирует от азооспермии до нормозооспермии [4, 15].

Для получения сперматозоидов при азооспермии используют различные методы: чрескожную аспирацию сперматозоидов из яичка (testicular sperm aspiration, TESA), открытую биопсию яичка с последующей экстракцией сперматозоидов (testicular sperm extraction, TESE) или микродиссекционную TESE (micro-TESE). TESA выполняют при обструктивной (реже – необструктивной) азооспермии. Успешность получения сперматозоидов при TESA, по данным разных авторов, составляет от 26 до 42 % [19]. При TESE и micro-TESE рассекают белочную оболочку яичка и забирают фрагмент его паренхимы. При micro-TESE забору фрагмента паренхимы тестикул предшествует интраоперационное микроскопическое выявление участков потенциально функционирующих извитых семенных канальцев. Данный метод позволяет взять для исследования небольшие участки семенных канальцев, не повреждая остальную ткань яичка [20]. Вероятность получения сперматозоидов с помощью microTESE в среднем в 1,5 раза выше, чем при использовании TESE, и в 2 раза выше, чем при применении TESA, а риск развития осложнений (интратестикулярной гематомы, гипогонадизма, фиброза тканей яичка, острого эпидидимита, гидроцеле) минимальный по сравнению с таковым при других методах [21]. Ретроспективный анализ результатов биопсии тестикулярной ткани пациентов с делециями региона AZFc показал, что эффективность microTESE статистически значимо выше эффективности TESE [22].

В настоящее время проводится активный поиск маркеров успешности получения сперматозоидов путем биопсии яичек у мужчин с бесплодием, и четкие критерии благоприятного прогноза пока не определены.

Цель исследования – оценить значение наличия микроделеций Y-хромосомы при прогнозировании успешности получения сперматозоидов при биопсии яичка у мужчин с азооспермией и олигозооспермией тяжелой степени.

Материалы и методы

Сбор биологических образцов (венозной крови и семенной жидкости) для исследования осуществляли в ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» и в отделении вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) ФГБУ «Национальный медицинский

исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России.

В исследование включены 109 мужчин репродуктивного возраста (от 21 до 56 лет, в среднем $32,7 \pm 0,2$ года) с бесплодием в браке. У всех пациентов ранее выявлена азооспермия или олигозооспермия тяжелой степени неуточненной этиологии.

Для выявления негенетических и генетических причин бесплодия провели комплексное обследование (общеклиническое, специальное андрологическое, спермиологическое и медико-генетическое).

Цитогенетическое исследование выполняли на препаратах метафазных хромосом культивированных лимфоцитов периферической крови с использованием метода GTG-окрашивания (в соответствии со стандартами).

Молекулярно-генетическое исследование проводили методом мультиплексной полимеразной цепной реакции. Для детекции полных делеций локуса AZF исследовали 7 ДНК-маркеров, специфичных для длинного плеча Y-хромосомы: sY84, sY86 и sY615 (регион AZFa), sY127 и sY134 (регион AZFb), sY254 и sY255 (регион AZFc) [11]. В качестве внутреннего положительного контроля результатов полимеразной цепной реакции выполняли амплификацию фрагментов гена *SRY* и X-Y-гомологичных генов *ZFX/ZFY*. Для выявления частичных делеций локуса AZF дополнительно анализировали 14 ДНК-маркеров, специфичных для Y-хромосомы: sY1316, sY1234 (регион AZFa); sY1237, sY1283, sY1235, sY121, sY124 и sY1302 (регион AZFb); sY142, sY1192, sY1197, sY1206, sY1291 и sY1125 (регион AZFc).

Спермиологический анализ осуществляли по стандартной методике, а его результаты оценивали согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения [23].

Фенотипический статус пациентов оценивали в процессе клинического обследования с учетом уровня гормонов (тестостерона, фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ), пролактина) и данных ультразвукового исследования органов мошонки и малого таза (объема яичек, наличия признаков гипоплазии тестикул и гипогонадизма, обструкции семявыносящих путей, варикоцеле и других андрологических заболеваний).

Биопсию тестикул проводили в отделении вспомогательных репродуктивных технологий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России и в отделении андрологии и репродукции человека НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. Забор фрагментов тестикулярной ткани выполняли с помощью методов TESA и microTESE в соответствии со стандартными протоколами [21].

Статистический анализ данных проводили с помощью программ Microsoft Excel 2016 и Statistica 10.0 с применением непараметрических методов математической статистики, критерия Пирсона и U-критерия Манна–Уитни. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

При цитогенетическом исследовании у 108 из 109 пациентов выявлен нормальный мужской кариотип (46,XY), у 1 – аномальный кариотип с наличием изоцентрической Y-хромосомы – 46,X,idic(Y)(q11.2).

У 34 (31,2 %) мужчин детектированы микроделеции длинного плеча Y-хромосомы. Полные делеции локуса AZF обнаружены у 25 (22,9 %) из 109, в том числе делеции региона AZFb – у 1 (0,9 %), регионов AZFb и AZFc (AZFb+c) – у 7 (6,4 %), региона AZFc – у 17 (15,6 %). Частичные делеции региона AZFc, представленные del b2/b3 (del sY1192) и del gr/gr (del sY1291), обнаружены у 5 (4,6 %) и 4 (3,7 %) мужчин соответственно.

При биопсии яичек сперматозоиды, пригодные для процедуры экстракорпорального оплодотворения по технологии интрацитоплазматической инъекции (intracytoplasmic sperm injection) (ЭКО/ICSI), получены у 54 (49,5 %) из 109 мужчин.

По наличию микроделеций Y-хромосомы пациенты распределены по 2 группам. В 1-ю группу вошли 75 мужчин с нормальным кариотипом и отсутствием делеций в локусе AZF, во 2-ю группу – 34 пациента с делециями. Возраст пациентов в 1-й группе варьировал от 21 до 47 лет (в среднем составив $32,6 \pm 5,4$ года), во 2-й – от 26 до 56 лет (в среднем $32,9 \pm 6,5$ года).

В 1-й группе диагностированы врожденные пороки развития органов половой системы: крипторхизм – у 6 (8 %) пациентов, монорхизм – у 2 (2,7 %) и головчатая форма гипоспадии – у 3 (4 %). Во 2-й группе у 2 (5,9 %) мужчин выявлен крипторхизм (у 1 – односторонний оперированный, у 1 – двусторонний, неоперированный).

По результатам стандартного спермиологического исследования в 1-й группе у 52 (69,3 %) пациентов диагностирована азооспермия, у 23 (30,7 %) – олигозооспермия тяжелой степени; во 2-й группе у 27 (79,4 %) – азооспермия, у 7 (20,6 %) мужчин – олигозооспермия тяжелой степени. Статистически значимых различий в частоте форм патозооспермии между группами не установлено ($p > 0,05$; $\chi^2 = 0,74$).

При ультразвуковом исследовании органов мошонки гипоплазия яичек диагностирована у 31 (41,3 %) и 19 (55,9 %) пациентов 1-й и 2-й групп соответственно. Статистически группы не различались по частоте гипоплазии яичек ($p > 0,05$; $\chi^2 = 1,88$). В 1-й группе средний объем левого яичка составил $13,5 \pm 7,3$ см³, правого – $13,4 \pm 6,7$ см³, во 2-й группе – соответственно

$11,3 \pm 4,4$ и $12,9 \pm 6,1$ см³. Общий объем яичек в 1-й и 2-й группах составил соответственно $16,6 \pm 16,5$ и $19,2 \pm 13,5$ см³. Статистически значимых различий в среднем объеме яичек между группами не выявлено ($p > 0,05$; $\chi^2 = 1,01$).

Варикоцеле диагностировано у 24 (32 %) пациентов 1-й группы и 10 (29,4 %) мужчин 2-й группы. Статистически группы не различались по частоте встречаемости варикоцеле ($p > 0,05$; $\chi^2 = 0,006$).

В результате биопсии тестикулярной ткани сперматозоиды, пригодные для процедуры ЭКО/ICSI, получены у 47 (62,7 %) и у 7 (20,6 %) пациентов 1-й и 2-й групп соответственно. Частота успешного получения сперматозоидов у мужчин без микроделеций локуса AZF статистически значимо выше ($p < 0,01$; $\chi^2 = 14,918$), чем у мужчин с микроделециями Y-хромосомы (табл. 1).

У пациентов 1-й и 2-й групп выявлены нормальные уровни общего тестостерона – соответственно у 63 (84 %) и 24 (70,6 %) пациентов, ФСГ – у 48 (64 %) и 22 (64,7 %), ЛГ – у 61 (81 %) и 23 (67,6 %), пролактин – у 64 (85 %) и 13 (38,2 %), ингибин В – у 31 (41 %) и 4 (11,76 %). Группы статистически не различались по уровням гормонов ($p > 0,05$) (табл. 2). Повышенный по сравнению с референсными показателями уровень ФСГ примерно с равной частотой встречался у мужчин 1-й (33,3 %) и 2-й (32,4 %) групп.

С целью более детального анализа данных мужчины с делециями локуса AZF распределены по 2 подгруппам: с полными ($n = 25$) и частичными ($n = 9$) делециями (табл. 3).

У 25 (100 %) мужчин с полными делециями локуса AZF выявлена азооспермия. У мужчин с частичными AZFc-делециями в 7 (77,8 %) случаев обнаружена азооспермия, в 2 (22,2 %) – олигозооспермия тяжелой степени. В подгруппе мужчин с полными делециями в 2 (8 %) случаях диагностирован крипторхизм, в 18 (72 %) – гипоплазия яичек, в 8 (32 %) – варикоцеле. Сперматозоиды в результате биопсии тестикулярной ткани успешно получены у 2 (8 %) пациентов данной подгруппы.

У пациентов с частичными делециями локуса AZF врожденные пороки развития половых органов не обнаружены; гипоплазия яичек диагностирована в 1 случае, варикоцеле – в 2. Сперматозоиды в результате биопсии ткани яичек получены у 5 (56 %) мужчин данной подгруппы. Подгруппы статистически значимо различались по частоте встречаемости гипоплазии яичек ($p < 0,05$).

Средние уровни гормонов в сыворотке крови у пациентов с полными и частичными делециями региона AZFc составили: тестостерона – соответственно $24,16 \pm 15,22$ и $14,22 \pm 4,58$ нмоль/л, ФСГ – $15,98 \pm 7,94$ и $5,54 \pm 4,9$ мМЕ/мл, ЛГ – $7,54 \pm 4,35$ и $3,09 \pm 1,64$ мМЕ/мл, пролактин – $250,87 \pm 110,89$ и $321,29 \pm 129,17$ мМЕ/л, ингибин В – $43,94 \pm 50,32$ и $180,65 \pm 116,28$ пг/мл. Концентрация общего тестостерона, ФСГ

Таблица 1. Частота различных форм патозооспермии, патологии мужских половых органов и успешного получения сперматозоидов у мужчин с бесплодием, имеющих и не имеющих микроделеции Y-хромосомы

Table 1. Frequency of various forms of pathozoospermia, pathology of male reproductive organs, and successful retrieval of spermatozoa in infertile men with and without Y chromosome microdeletions

Параметр Parameter		Пациенты с отсутствием делеций (n = 75) Patients without deletions (n = 75)		Пациенты с делециями (n = 34) Patients with deletions (n = 34)	
		абс. abs.	%	абс. abs.	%
Форма патозооспермии Pathozoospermia form	Азооспермия Azoospermia	52	69,3	27	79,4
	Олигозооспермия тяжелой степени Severe oligozoospermia	23	30,7	7	20,6
Врожденные пороки развития органов репродуктивной системы Congenital developmental defects of the reproductive organs	Крипторхизм Cryptorchidism	6	8,0	2	5,9
	Гипоспадия Hypospadias	3	4,0	0	0
	Монорхизм Monorchism	2	2,7	0	0
Результат ультразвукового исследования органов мошонки Result of ultrasound examination of the scrotal organs	Гипоплазия яичек Testicular hypoplasia	31	41,3	19	55,9
	Варикоцеле Varicocele	24	32,0	10	29,4
Получены сперматозоиды Spermatozoa retrieved		47	62,7	7*	20,6*

* Различия между группами статистически значимы ($p < 0,01$).

* Differences between the groups are statistically significant ($p < 0.01$).

Таблица 2. Уровень гормонов в сыворотке крови у мужчин с бесплодием, имеющих и не имеющих микроделеции Y-хромосомы, $M \pm SD$

Table 2. Serum hormone levels in infertile men with and without Y chromosome microdeletions, $M \pm SD$

Гормон Hormone	Пациенты с отсутствием делеций (n = 75) Patients without deletions (n = 75)	Пациенты с делециями (n = 34) Patients with deletions (n = 34)
Тестостерон, нмоль/л Testosterone, nmol/l	17,82 ± 9,46	21,84 ± 14,09
Фолликулостимулирующий гормон, мМЕ/мл Follicle-stimulating hormone, mIU/ml	12,56 ± 13,21	13,04 ± 8,58
Лютеинизирующий гормон, мМЕ/мл Luteinizing hormone, mIU/ml	5,74 ± 3,61	6,47 ± 4,30
Пролактин, мМЕ/л Prolactin, mIU/l	228,07 ± 91,17	265,96 ± 113,69
Ингибин В, пг/мл Inhibin, pg/ml	122,24 ± 139,97	75,01 ± 89,13

и ЛГ у мужчин с полными делециями статистически значимо выше, а уровень ингибина В — ниже, чем у мужчин с частичными делециями региона AZFc ($p < 0,05$). Подгруппы статистически значимо не различались по уровню пролактина ($p > 0,05$).

В ходе исследования было решено разделить пациентов на группы по другому критерию — по успешности получения сперматозоидов при биопсии тестикулярной ткани. В 1-ю группу вошли 54 пациента, у которых удалось получить сперматозоиды, во 2-ю —

Таблица 3. Частота различных форм патозооспермии, патологии мужских половых органов и успешного получения сперматозоидов у мужчин с полными и частичными делециями локуса AZF

Table 3. Frequency of various forms of pathozoospermia, pathology of male reproductive organs, and successful retrieval of spermatozoa in men with complete and partial deletions in the AZF locus

Параметр Parameter		Пациенты с полными делециями (n = 25) Patients with complete deletions (n = 25)		Пациенты с частичными делециями (n = 9) Patients with partial deletions (n = 9)	
		абс. abs.	%	абс. abs.	%
Форма патозооспермии Pathozoospermia form	Азооспермия Azoospermia	25	100	7	77,8
	Олигозооспермия тяжелой степени Severe oligozoospermia	–	–	2	22,2
Крипторхизм Cryptorchidism		2	8,0	–	–
Гипоплазия яичек Testicular hypoplasia		18	72,0	1	11,1
Варикоцеле Varicocele		8	32,0	2	22,2
Получены сперматозоиды Spermatozoa retrieved		2	8,0	5	55,6

55 мужчин с отрицательными результатами биопсии яичка (табл. 4).

В 1-й группе микроделеции Y-хромосомы обнаружены у 7 (13 %) мужчин: у 2 (3,7 %) – полная делеция региона AZFc (del b2/b4), у 5 (9,3 %) – частичные делеции региона AZFc (del b2/b3 и del gr/gr). Делеции региона AZFb и регионов AZFb+c в данной группе не выявлены.

Во 2-й группе микроделеции Y-хромосомы детектированы у 27 (49 %) мужчин: у 1 (1,8 %) – полные делеции региона AZFb, у 7 (12,7 %) – делеции регионов AZFb и AZFc, у 15 (27,3 %) – делеции региона AZFc. Обнаружены статистически значимые различия делеций между данными группами в частоте встречаемости делеций локуса AZF ($p < 0,01$; $\chi^2 = 14,918$).

Азооспермия в 1-й и 2-й группах диагностирована у 47 (87 %) и 50 (91 %) пациентов соответственно. Статистически значимых различий в частоте данной формы патозооспермии между группами не выявлено ($p > 0,05$; $\chi^2 = 0,115$).

Гипоплазия яичек диагностирована у 13 (24,1 %) мужчин 1-й группы и у 17 (31,5 %) мужчин 2-й группы, варикоцеле – у 37 (67,3 %) и 17 (30,9 %) соответственно. Статистически значимо группы различались только по частоте гипоплазии яичек ($p < 0,01$; $\chi^2 = 18,773$).

Врожденные пороки развития органов мужской репродуктивной системы (крипторхизм, гипоспадия, монорхизм) обнаружены у 9 (16,7 %) пациентов 1-й группы и у 5 (9,1 %) мужчин 2-й группы. Различия

между группами в их частоте статистически незначимы ($p > 0,05$; $\chi^2 = 1,323$).

Сравнительный анализ уровня гормонов у пациентов двух групп позволил выявить статистически значимые различия между ними в уровне ФСГ, ЛГ и ингибина В (табл. 5).

Обсуждение

Азооспермия и олигозооспермия тяжелой степени – формы патозооспермии, различающиеся этиологией, патогенезом, степенью сохранности сперматогенеза и имеющие разный прогноз в отношении успешности биопсии тестикулярной ткани и возможности осуществления репродукции с помощью ВРТ. Данные спермиологические нарушения часто обусловлены генетическими причинами или связаны с генетическими факторами, в том числе с микроделециями длинного плеча Y-хромосомы [4, 5, 15].

В настоящее время не определены четкие критерии прогнозирования успешности биопсии тестикулярной ткани при необструктивной азооспермии. Многие авторы исследовали возможность использования таких критериев, как возраст, объем тестикул, уровень гормонов в сыворотке крови [24–29].

Анализ данных пациентов с микроделециями и без микроделеций Y-хромосомы не выявил статистически значимых различий групп по возрасту, объему тестикул и средним уровням гормонов. Статистически значимые различия между группами установлены только в частоте успешного получения

Таблица 4. Частота успешного получения сперматозоидов с помощью биопсии яичка у мужчин с бесплодием в зависимости от наличия микроделений Y-хромосомы, а также различных форм патозооспермии и андрологических нарушений

Table 4. Frequency of successful biopsy of testicular tissue in infertile men in depending of Y chromosome microdeletions, various forms of pathozoospermia, and pathology of male reproductive organs

Параметр Parameter		Пациенты, у которых сперматозоиды получены (n = 54) Patients with spermatozoa retrieval (n = 54)		Пациенты, у которых сперматозоиды не получены (n = 55) Patients without spermatozoa retrieval (n = 55)	
		абс. abs.	%	абс. abs.	%
Полные делеции локуса AZF Complete deletions in the AZF locus	del AZFb	0	0	1	1,8
	del AZFb+c	0	0	7	12,7
	del AZFc	2	3,7	15	27,3
Частичные делеции региона AZFc Partial deletions in the AZFc region	del b2/b3	3	5,6	2	3,6
	del gr/gr	2	3,7	2	3,6
Отсутствие делеций в локусе AZF No deletions in the AZF locus		47	87,0	28*	50,9*
Форма патозооспермии Pathozoospermia form	Азооспермия Azoospermia	47	87,0	50	90,9
	Олигозооспермия тяжелой степени Severe oligozoospermia	7	13,0	5	9,1
Гипоплазия яичек Testicular hypoplasia		13	24,1	37*	67,3*
Варикоцеле Varicocele		17	31,5	17	30,9
Крипторхизм Cryptorchidism		4	7,4	4	7,3
Гипоспадия Hypospadias		3	5,6	0	0
Монорхизм Monorchism		2	3,7	1	1,8

* Различия между группами статистически значимы ($p < 0,01$).

* Differences between the groups are statistically significant ($p < 0.01$).

сперматозоидов: у мужчин без микроделений в локусе AZF данный показатель выше, чем у мужчин с микроделениями. Другие авторы отмечали более высокий уровень ФСГ у пациентов с микроделениями Y-хромосомы, чем у мужчин без микроделений, в то время как уровни ЛГ и тестостерона оставались в пределах нормы [24].

При сравнении результатов обследования пациентов, распределенных по группам в соответствии с результатами биопсии тестикулярной ткани (положительными или отрицательными), выявлены статистически значимые различия в наличии микроделений Y-хромосомы, частоте гипоплазии яичек, а также уровнях ФСГ, ЛГ, ингибина В. Сходные данные представлены

в работах других исследователей [30]. А. Tsujimura показал, что наибольшую информативность в отношении сохранности сперматогенеза и успешности получения сперматозоидов с помощью биопсии имеют концентрации ФСГ, общего тестостерона и ингибина В, однако они не являются решающим критерием хорошего прогноза биопсии [25]. В нашем исследовании в группе мужчин, у которых в результате биопсии тестикулярной ткани получены сперматозоиды, отмечены более низкие уровни ФСГ и ЛГ и более высокий уровень ингибина В, чем у мужчин, у которых не удалось получить сперматозоиды. Гипоплазия яичек статистически значимо ($p < 0,05$) чаще встречалась в группе пациентов, у которых сперматозоиды не обнаружены.

Таблица 5. Уровень гормонов в сыворотке крови у мужчин с успешной биопсией тестикулярной ткани и у мужчин, у которых получить сперматозоиды не удалось, $M \pm SD$

Table 5. Serum hormone levels in men with successful biopsy of testicular tissue and in men from whom spermatozoa were not retrieved, $M \pm SD$

Гормон Hormone	Пациенты, у которых сперматозоиды получены ($n = 54$) Patients with spermatozoa retrieval ($n = 54$)	Пациенты, у которых сперматозоиды не получены ($n = 55$) Patients without spermatozoa retrieval ($n = 55$)
Тестостерон, нмоль/л Testosterone, nmol/l	18,16 ± 6,87	20,26 ± 14,0
Фолликулостимулирующий гормон, мМЕ/мл Follicle-stimulating hormone, mIU/ml	9,45 ± 13,25	15,13 ± 9,52*
Лютеинизирующий гормон, мМЕ/мл Luteinizing hormone, mIU/ml	4,94 ± 3,62	6,83 ± 3,9*
Пролактин, мМЕ/л Prolactin, mIU/l	229,06 ± 91,83	244,25 ± 102,95
Ингибин В, пг/мл Inhibin, pg/ml	158,81 ± 146,51	57,27 ± 79,13*

* Различия между группами статистически значимы ($p < 0,05$).

* Differences between the groups are statistically significant ($p < 0.05$).

Многие авторы указывают, что наличие делеций локуса AZF существенно снижает вероятность обнаружения пригодных для искусственного оплодотворения сперматозоидов при биопсии тестикулярной ткани, при этом принципиальное значение имеет тип делеции. Мы установили, что при микроделециях регионов AZFa, AZFa+b, AZFb+c или AZFa+b+c прогноз для получения сперматозоидов неблагоприятный, что соответствует выводам других авторов [10, 22, 27–29, 31].

По нашим данным, группы мужчин с полными и частичными делециями локуса AZF статистически значимо различаются по уровню некоторых гормонов: у мужчин с полными делециями выявлены более высокие уровни тестостерона, ФСГ и ЛГ и более низкий уровень ингибина В, чем у мужчин с частичными делециями. Согласно научным источникам, подобный сравнительный анализ пациентов с полными и частичными делециями ранее никем не выполнялся. Следует отметить, что в других исследованиях исключительно или преимущественно учитывалась успешность получения сперматозоидов и/или программ ЭКО/ICSI у мужчин с микроделециями Y-хромосомы [18, 32, 26].

Заключение

Таким образом, генетический анализ на наличие микроделеций Y-хромосомы, а также стандартное цитогенетическое исследование могут быть использованы в качестве теста для прогнозирования успешности получения сперматозоидов при биопсии яичка, в том числе методом microTESE. Так как отсутствуют четкие клинические различия между мужчинами с азооспермией и олигозооспермией тяжелой степени неясной этиологии, имеющими и не имеющими делеции локуса AZF, им следует рекомендовать молекулярно-генетическое обследование на наличие микроделеций Y-хромосомы. Это исследование актуально не только для диагностики генетической причины мужского бесплодия, но и для прогноза успешности тестикулярной биопсии, оценки риска генетических нарушений у потомства. В связи с наличием разных типов делеций локуса AZF, их гетерогенностью и неодинаковой степенью негативного влияния на сперматогенез и мужскую фертильность необходимо продолжить исследования на больших выборках мужчин с бесплодием для дальнейшего поиска критериев успешности получения сперматозоидов, пригодных для ЭКО/ICSI, и эффективности программ ВРТ, а также возможностей сохранения потенциала фертильности у пациентов с нарушением репродуктивной функции.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Skakkebaek N.E., Rajpert-De Meyts E., Buck Louis G.M. et al. Male reproductive disorders and fertility trends: influences of environment and genetic susceptibility. *Physiol Rev* 2016;96(1):55–97. DOI: 10.1152/physrev.00017.2015. PMID: 26582516.
- Matsumiya K., Namiki M., Takahara S. et al. Clinical study of azoospermia. *Int J Androl* 1994;17(3):140–2. PMID: 7960188.
- Raman J.D., Schlegel P.N. Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection is successful for the treatment of nonobstructive azoospermia associated with cryptorchidism. *J Urol*

- 2003;170(4 Pt 1):1287–90.
DOI: 10.1097/01.ju.0000080707.75753.ec.
PMID: 14501743.
4. 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.)].
 5. Черных В.Б., Курило Л.Ф., Шилейко Л.В. и др. Анализ микроделеций в локусе AZF у мужчин с бесплодием: совместный опыт исследований. Медицинская генетика 2003;2(8):367–79. [Chernykh V.B., Kurilo L.F., Shileyko L.V. et al. Microdeletion analysis of AZF locus in infertile males: cooperative experience of research work. Meditsinskaya genetika = Medical Genetics 2003;2(8):367–79. (In Russ.)].
 6. Hamada A.J., Esteves S.C., Agarwal A. A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia. Clinics (Sao Paulo) 2013;68 Suppl 1:39–60. PMID: 23503954.
 7. Navarro-Costa P., Plancha C.E., Goncalves J. Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in)fertility? J Biomed Biotechnol 2010;20(10):936569. DOI: 10.1155/2010/936569. PMID: 20671934.
 8. Suganthi R., Vijesh V.V., Vandana N., Fathima Ali Benazir J. Y chromosomal microdeletion screening in the workup of male infertility and its current status in India. Int J Fertil Steril 2014;7(4): 253–66. PMID: 24520494.
 9. Poongothai J., Gopenath T.S., Manonayaki S. Genetics of human male infertility. Singapore Med J 2009;50(4):336–47. PMID: 19421675.
 10. Vogt P.H., Edelmann A., Kirsh S. et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. Hum Mol Genet 1996;5(7):933–43. PMID: 8817327.
 11. Черных В.Б., Чухрова А.Л., Бескоровайная Т.С. и др. Типы делеций Y-хромосомы и их частота у мужчин с бесплодием. Генетика 2006;42(8):1130–6. [Chernykh V.B., Chukhrova A.L., Beskorovainaya T.S. et al. Types of y chromosome deletions and their frequency in infertile men. Genetika = Russian Journal of Genetics 2006;42(8):1130–6. (In Russ.)].
 12. Krausz C., McElreavey K. Y chromosome and male infertility. Front Biosci 1999;4:E1–8. PMID: 9889182.
 13. Yu X.W., Wei Z.T., Jiang Y.T., Zhang S.L. Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and transmission characteristics in azoospermic and severe oligozoospermic patients. Int J Clin Exp Med 2015;8(9):14634–46. PMID: 26628946.
 14. Гоголевский П.А., Гоголевская И.К., Крамеров Д.А. и др. AZF-микроделеции и мужское бесплодие. Андрология и генитальная хирургия 2001;(4):73–8. [Gogolevsky P.A., Gogolevskaya I.K., Kramerov D.A. et al. AZF microdeletions and male infertility. Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery 2001;(4):73–8. (In Russ.)].
 15. Черных В.Б., Руднева С.А., Сорокина Т.М. и др. Характеристика состояния сперматогенеза у мужчин с бесплодием, имеющих различные типы делеций AZFc-региона. Андрология и генитальная хирургия 2014;15(2):48–57. [Chernykh V.B., Rudneva S.A., Sorokina T.M. et al. Characteristics of spermatogenesis in infertile men with the AZFc region deletions. Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery 2014;15(2):48–57. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2070-9781-2014-2-48-57.
 16. 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. PMID: 12871878.
 17. Ferlin A., Speltra E., Garolla A. et al. Y chromosome haplogroups and susceptibility to testicular cancer. Mol Hum Reprod 2007;13(9):615–9. DOI: 10.1093/molehr/gam052. PMID: 17682003.
 18. Oates R.D., Silber S., Brown L.G., Page D.C. Clinical characterization of 42 oligospermic or azoospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI. Hum Reprod 2002;17(11):2813–24. PMID: 12407032.
 19. Hauser R., Yorgev L., Paz G. et al. Comparison of efficacy of two techniques for testicular sperm retrieval in nonobstructive azoospermia: multifocal testicular sperm extraction versus multifocal testicular sperm aspiration. J Androl 2006;27(1):28–33. DOI: 10.2164/jandrol.05055. PMID: 16400074.
 20. Schlegel P.N. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. Hum Reprod 1999;14(1):131–5. PMID: 10374109.
 21. Аль-Шукри С.Х., Боровец С.Ю., Торопов В.А. и др. Частота обнаружения сперматозоидов и вероятность осложнений после различных видов биопсии яичка (TESA, TESE и micro-TESE у больных с необструктивной азооспермией. Ученые записки СПбГМУ им. И.П. Павлова 2016;23(1):10–4. [AlShukri S.Kh., Borovets S.U., Toropov V.A. et al. The frequency of detection of sperm and probability of postoperation complications after TESA, TESE and microTESE in patients with nonobstructive azoospermia. Uchenye zapiski SpbGMU im. I.P. Pavlova = Scientific Notes of IPP-SPSMU 2016;23(1):10–4. (In Russ.)].
 22. Schwarzer J.U., Steinfatt H., Schleyer M. et al. Microdissection TESE is superior to conventional TESE in patients with nonobstructive azoospermia caused by Y chromosome microdeletions. Andrologia 2016;48(4):402–5. DOI: 10.1111/and.12460. PMID: 26304126.
 23. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. WHO Press, 2010.
 24. Foresta C., Moro E., Ferlin A. Prognostic value of Y deletion analysis. The role of current methods. Hum Reprod 2001;16(8):1543–7. PMID: 11473940.
 25. Tsujimura A. Microdissection testicular sperm extraction: prediction, outcome, and complications. Int J Urol 2007;14(10):883–9. DOI: 10.1111/j.1442-2042.2007.01828.x. PMID: 17880285.
 26. Kim M.J., Choi H.W., Park S.Y. et al. Molecular and cytogenetic studies of 101 infertile men with microdeletions of Y chromosome in 1,306 infertile Korean men. J Assist Reprod Genet 2012;29(6):539–46. DOI: 10.1007/s10815-012-9748-4. PMID: 22456825.
 27. Fu L., Ding X.P., Shen M.J. et al. [Screening and clinical phenotype analysis of microdeletions of azoospermia factor region on Y chromosome in 1011 infertile men (In Chinese)]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi 2012;29(2):184–7. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2012.02.015. PMID: 22487830.
 28. Liow S.L., Yong E.L., Ng S.C. Prognostic value of Y deletion analysis: how reliable is the outcome of Y deletion analysis in providing a sound prognosis? Hum Reprod 2001;16(1):9–12. PMID: 11139528.
 29. Krausz C., Quintana-Murci L., McElreavey K. Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? Hum Reprod 2000;15(7):1431–4. PMID: 10875846.
 30. Cetinkaya M., Onem K., Zorba O.U. et al. Evaluation of microdissection testicular sperm extraction results in patients with non-obstructive azoospermia: independent predictive factors and best cutoff values for sperm retrieval. Urol J 2015;12(6):2436–43. PMID: 26706742.
 31. 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. PMID: 9804236.
 32. Sabbaghian M., Mohseni Meybodi A., Rafeae A. et al. Sperm retrieval rate and reproductive outcome of infertile men with azoospermia factor C deletion. Andrologia 2018;50(7):1–6. DOI: 10.1111/and.13052. PMID: 29920741.



Вклад авторов

Т.А. Яманди: анализ полученных данных (включая статистический), обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;
Л.В. Акуленко: разработка дизайна исследования;
Н.Ю. Сафина: анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи;
И.И. Витязева: получение данных для анализа;
С.В. Боголюбов: получение данных для анализа;
Я.И. Мельник: получение данных для анализа;
Е.В. Касатонова: получение данных для анализа;
А.В. Поляков: разработка дизайна исследования;
М.В. Андреева: анализ полученных данных (включая статистический);
В.Б. Черных: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи.

Authors' contributions

T.A. Yamandi: analysis of the obtained data (including statistics), reviewing of publications of the article's theme, article writing;
L.V. Akulenko: developing the research design;
N.Yu. Safina: analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme;
I.I. Vityazeva: obtaining data for analysis;
S.V. Bogolubov: obtaining data for analysis;
Ya.I. Melnik: obtaining data for analysis;
E.V. Kasatonova: obtaining data for analysis;
A.V. Polyakov: developing the research design;
M.V. Andreeva: analysis of the obtained data (including statistics);
V.B. Chernykh: developing the research design, analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme.

ORCID авторов / ORCID of authors

Т.А. Яманди / T.A. Yamandi: <https://orcid.org/0000-0002-0347-7475>
Л.В. Акуленко / L.V. Akulenko: <https://orcid.org/0000-0002-2959-0716>
Н.Ю. Сафина / N.Yu. Safina: <https://orcid.org/0000-0002-6236-0445>
И.И. Витязева / I.I. Vityazeva: <https://orcid.org/0000-0002-7916-02-12>
С.В. Боголюбов / S.V. Bogolubov: <https://orcid.org/0000-0003-1974-5005>
Я.И. Мельник / Ya.I. Melnik: <https://orcid.org/0000-0003-4940-2433>
Е.В. Касатонова / E.V. Kasatonova: <https://orcid.org/0000-0003-3279-2682>
А.В. Поляков / A.V. Polyakov: <https://orcid.org/0000-0002-0105-1833>
М.В. Андреева / M.V. Andreeva: <https://orcid.org/0000-0002-5048-5486>
В.Б. Черных / V.B. Chernykh: <https://orcid.org/0000-0002-7615-8512>

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.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.
Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.