

УДК 616.69–008.6/8:577.115
<https://doi.org/10.21886/2308-6424-2021-9-4-30-39>



Липидомный профиль семенной плазмы при необструктивной азооспермии с остановкой созревания сперматозоидов

© Сафар И. Гамидов^{1,2}, Тарас В. Шатылко¹, Алихан Х. Тамбиев²,
Алиса О. Токарева¹, Виталий В. Чаговец¹, Тимур Б. Бицоев²,
Наталья Л. Стародубцева¹, Алина Ю. Попова¹, Владимир Е. Франкевич¹

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

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)
119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Аннотация

Введение. Различие между обструктивной азооспермией и необструктивной азооспермией с остановкой созревания сперматозоидов имеет важное значение для выбора тактики лечения и адекватного консультирования супружеской пары.

Цель исследования. Оценка липидомного профиля эякулята у пациентов с остановкой созревания сперматозоидов.

Материалы и методы. Исследованы образцы семенной плазмы на липидомный состав 24 мужчин с нормозооспермией и 64 мужчин с азооспермией, последним была проведена микродиссекционная биопсия яичка с последующим гистологическим исследованием. Из эякулята выделены липиды методом экстракции Фолча. Данные липидомного анализа были сопоставлены с результатами патоморфологического исследования.

Результаты. При сравнении группы с остановкой созревания сперматозоидов и группы контроля были выбраны как статистически значимые 22 липида в режиме положительных ионов и 11 липидов в режиме отрицательных ионов. Липиды преимущественно относятся к классам (гексозил) церамидов, сфингомиелинов и фосфотидилхолинов — простых эфиров и окисленных липидов. При многофакторном анализе статистически значимыми предикторами остановки созревания сперматозоидов оказались содержание следующих липидов: *PC 16:0_22:6* (β -коэффициент: -0,73; 95% доверительный интервал (ДИ): от -1,42 до -0,27; отношение шансов (ОШ): 0,48; доверительный интервал отношения шансов (ДИ ОШ): от 0,24 до 0,76; критерий Вальда: -2,58; $p = 0,01$); *SM d20:1/22:2* (β -коэффициент: 4,96; 95% ДИ: от 2,29 до 9,13; ОШ: 142,31; ДИ ОШ: от 9,90 – 9,22¹⁰³; критерий Вальда: 2,93; $p = 0,003$); *PG 20:3_22:6* (β -коэффициент: 2,52; 95% ДИ: от 1,13 до 4,49; ОШ: 12,37; ДИ ОШ: от 3,10 до 89,27; критерий Вальда: 3,02; $p = 0,002$); *PC O- 16:1/16:0* (β -коэффициент: -1,96; 95% ДИ: от -4,12 до 0,27; ОШ: 0,14; ДИ ОШ: от 0,02 до 0,76; критерий Вальда: -2,05; $p = 0,04$). Характеристика модели для диагностики остановки созревания сперматозоидов, полученная в ходе кросс-валидации в режиме положительных ионов: чувствительность — 91%, специфичность — 85%; в режиме отрицательных ионов: чувствительность — 75%; специфичность — 81%.

Заключение. Несмотря на то, что и у фертильных мужчин, и у мужчин с гомогенной остановкой созревания сперматозоидов в равной мере сохранены ранние этапы сперматогенеза, эякулят у исследуемой группы пациентов отличается по своему липидному профилю. Пациенты с необструктивной азооспермией, в частности на фоне остановки мейоза, могут иметь уникальные липидомные характеристики семенной плазмы, которые в будущем возможно позволят дифференцировать различные варианты тяжёлого мужского бесплодия с помощью неинвазивных методов.

Ключевые слова: азооспермия; остановка созревания сперматозоидов; липидом эякулята; семенная плазма

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и ГФЕН в рамках научного проекта № 19–515–55021 Китай_а.
Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. **Этическое одобрение.** Исследование одобрено локальным этическим комитетом Сеченовского университета (Протокол № 03–20 от 19 февраля 2020 года). **Информированное согласие.** Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Вклад авторов: С.И. Гамидов — концепция и дизайн исследования, научное редактирование текста; Т.В. Шатылко — доработка текста, итоговые выводы; А.Х. Тамбиев — сбор и интерпретация данных, обзор публикаций по теме исследования, написание исходного текста; А.О. Токарева — статистическая обработка и интерпретация данных; В.В. Чаговец — работа с биологическим материалом, получение данных для

анализа; Т. Б. Бицоев — сбор данных, обзор публикаций по теме исследования; Н. Л. Стародубцева — концепция и дизайн исследования, работа с биологическим материалом, получение данных для анализа, написание исходного текста; А. Ю. Попова — научное редактирование текста; В. Е. Франкевич — концепция и дизайн исследования, работа с биологическим материалом, получение данных для анализа.

✉ **Автор, ответственный за переписку:** Алихан Халитович Тамбиев; e-mail: dr.tambiev@gmail.com

Поступила в редакцию: 09.09.2021. **Принята к публикации:** 09.11.2021. **Опубликована:** 26.12.2021.

Для цитирования: Гамидов С. И., Шатылко Т. В., Тамбиев А. Х., Токарева А. О., Чаговец В. В., Бицоев Т. Б., Стародубцева Н. Л., Попова А. Ю., Франкевич В. Е. Липидомный профиль семенной плазмы при необструктивной азооспермии с остановкой созревания сперматозоидов. *Вестник урологии*. 2021;9(4):30–39. DOI: 10.21886/2308–6424–2021–9–4–30–39.

Lipidomic profile of seminal plasma in non-obstructive azoospermia with sperm maturation arrest

© Safar I. Gamidov^{1,2}, Taras V. Shatylo¹, Alikhan Kh. Tambiev², Alisa O. Tokareva¹, Vitaliy V. Chagovets¹, Timur B. Bitsoev², Natalia L. Starodubtseva¹, Alina Yu. Popova¹, Vladimir E. Frankevich¹

¹ Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology
117997, Russian Federation, Moscow, 4 Oparina St.,

² Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)
119991, Russian Federation, Moscow, 8 Trubetskaya St. bldg. 2

Abstract

Introduction. The difference between obstructive and non-obstructive azoospermia with sperm maturation arrest is important for the choice of treatment tactics and adequate counseling of a married couple.

Purpose of the study. The study aimed to assess the semen lipid profile in patients with sperm maturation arrest.

Materials and methods. Samples of seminal plasma for lipid composition of 24 men with normozoospermia and 64 men with azoospermia were studied. Patients with azoospermia underwent microdissection testicular biopsy followed by the detection of testicular tissue pathology. Lipid extracts were analyzed by liquid chromatography with mass spectrometry. Lipid data were compared with the results of pathomorphological studies.

Results. Comparison of two groups revealed a statistically significant concentration differences for 22 lipids detected in positive-ion mode and 11 lipids detected in negative-ion mode. Those lipids mainly belong to the classes hexosylceramides, sphingomyelins and phosphatidylcholines — simple ethers and oxidized lipids. In multivariate analysis, the following lipids were found to be statistically significant predictors of sperm maturation arrest: PC 16: 0_22: 6 lipid (β -coefficient: -0.73; 95% confidence interval (95% CI): -1.42 to -0.27; odds ratio (OR): 0.48; OR CI: 0.24 to 0.76; Wald's test: -2.58; $p = 0.01$), SM d20: 1/22: 2 lipid (β -coefficient 4.96; 95% CI 2.29 to 9.13; OR: 142.31; OR CI: 9.90 to 9.22¹⁰³; Wald's test: 2.93; $p = 0.003$); PG 20: 3_22: 6 lipid (β -coefficient 2.52; 95% CI 1.13 to 4.49; OR: 12.37; OR CI: 3.10 to 89.27; Wald's test: 3.02; $p = 0.002$); PC O- 16: 1/16: 0 lipid (β -coefficient 1.96; 95% CI -4.12 to 0.27; OR: 0.14; OR CI: 0.02 to 0.76; Wald's test: -2.05; $p = 0.04$). The prediction model characteristics of sperm maturation arrest, obtained during cross-validation in the positive-ion mode composed: sensitivity 91%, specificity 85%; in negative-ion mode: sensitivity 75%; specificity 81%.

Conclusions. Even though early stages of spermatogenesis are equally preserved in both fertile men and men with homogeneous sperm maturation arrest, the semen in the studied group of patients differed in its lipid profile. Patients with non-obstructive azoospermia, associated with meiosis arrest, may have unique lipidomic characteristics of seminal plasma, which in the future will make it possible to differentiate various variants of severe male infertility using non-invasive methods.

Keywords: azoospermia; sperm maturation arrest; semen lipidomics; seminal plasma

Financing. The study was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research (RFBR) and The National Natural Science Foundation of China (NSFC) in the framework of a scientific project № 19–515–55021 China. **Conflict of interests.** The authors declare no conflicts of interest. **Ethical approval.** The study was approved by the Ethics Committee of Sechenov University (Protocol No. 03–20, dated 02/19/2020). **Informed consent.** All patients signed informed consent to participate in the study.

Authors' contribution: Safar I. Gamidov — research design development, scientific editing; Taras V. Shatylo — scientific editing, final conclusions; Alikhan Kh. Tambiev — data acquisition and analysis, literature review, drafting the manuscript; Alisa O. Tokareva — data statistical processing and analysis; Vitaliy V. Chagovets — biological material processing, data acquisition; Timur B. Bitsoev — data acquisition, literature review; Natalia L. Starodubtseva — research design development, biological material processing, data acquisition, drafting the manuscript; Alina Yu. Popova — scientific editing; Vladimir E. Frankevich — research design development, biological material processing, data acquisition.

✉ **Corresponding author:** Alikhan Kh. Tambiev; e-mail: dr.tambiev@gmail.com

Received: 09/09/2021. **Accepted:** 11/09/2021. **Published:** 12/26/2021.

For citation: Gamidov S.I., Shatylo T.V., Tambiev A.Kh., Tokareva A.O., Chagovets V.V., Bitsoev T.B., Starodubtseva N.L., Popova A.Yu., Frankevich V.E. Lipidomic profile of seminal plasma in non-obstructive azoospermia with sperm maturation arrest. *Vestn. Urol.* 2021;9(4):30–39. (In Russ.). DOI: 10.21886/2308–6424–2021–9–4–30–39.

Введение

Азооспермия, определяемая как отсутствие сперматозоидов в эякуляте, выявляется примерно у 1% мужского населения и у 10–15% бесплодных мужчин [1, 2]. В отличие от обструктивной азооспермии, при которой имеется обструкция семявыносящих протоков, необструктивная азооспермия характеризуется полным отсутствием сперматозоидов в семенной жидкости из-за минимального сперматогенеза или его отсутствия. Мужчины с необструктивной азооспермией представляют собой наиболее сложную для лечения категорию бесплодных мужчин. По сравнению с фертильными мужчинами у них обычно повышен уровень фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), снижен уровень общего тестостерона в сыворотке крови и уменьшен объём яичек. Чтобы инициировать биологическую беременность, им обычно требуется процедура экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ICSI) с использованием тестикулярных сперматозоидов, полученных хирургическим путём [3]. К сожалению, частота хирургической экстракции сперматозоидов у мужчин с необструктивной азооспермией остаётся низкой [4].

Гистопатологические диагнозы, основанные на биопсии яичек у мужчин с необструктивной азооспермией, включают Сертоли-клеточный синдром (SCO-синдром), гипосперматогенез и остановку созревания сперматозоидов, определяемых наличием половых клеток, не достигших полного созревания. Однородная остановка созревания сперматозоидов характеризуется остановкой сперматогенеза на одной и той же стадии во всех семенных канальцах [5]. Она подразделяется на раннюю, в которой обнаруживаются только сперматогонии или сперматоциты, и позднюю, в которой обнаруживаются сперматиды без сперматозоидов [6, 7]. У некоторых мужчин с остановкой созревания сперматозоидов могут быть очаги сперматогенеза в яичках, и сперматозоиды, обнаруженные в этих локусах при microTESE, могут быть использованы для процедуры ЭКО/ICSI [5].

Остановка созревания сперматозоидов может быть первичной (генетической или идиопатической) или приобретённой. К приобретённым причинам относятся ятрогенные состояния (химиотерапия, лучевая терапия, лекарственная терапия и добавки тестосте-

рона), перенесённые инфекции, эндокринопатии, врождённые аномалии (крипторхизм), перекрут яичка и варикоцеле [8]. У таких пациентов, как и у пациентов с обструктивной азооспермией, нормальный уровень сывороточных гормонов (ФСГ, лютеинизирующего гормона, тестостерона и пролактина) и объём яичек [9]. Но есть и противоречивые данные. Так T. Ishikawa et al. обнаружили, что у лиц с более поздними стадиями остановки созревания сперматозоидов был более низкий уровень ФСГ и больший диаметр семенных канальцев, чем у мужчин с более ранними стадиями [8]. Сообщалось также, что у пациентов с остановкой созревания сперматозоидов чаще выявляются генетические аномалии, такие как микроделеции Y-хромосомы и карипотипические аномалии [5, 10, 11, 12].

A. J. Hung et al. сообщили, что у мужчин с однородной остановкой созревания сперматозоидов и нормальным ФСГ была более низкая частота хирургической экстракции сперматозоидов с помощью microTESE и худшие результаты ЭКО/ICSI, чем у других мужчин с необструктивной азооспермией [5]. Для мужчин с обструктивной азооспермией, например тех, кто ранее перенёс вазэктомию, частота хирургической экстракции сперматозоидов должна составлять практически 100% [13]. Однако несмотря на то, что прогнозы по номограмме, зависящие от размера яичек и уровня ФСГ в сыворотке, порой эффективны для дифференциации мужчин с необструктивной азооспермией и идиопатической обструктивной азооспермией, они не совсем точны [14]. Кроме того, у мужчин с гистологией остановки созревания сперматозоидов могут быть нормальный объём яичек и относительно более низкий уровень ФСГ по сравнению с другими гистологическими подтипами необструктивной азооспермией, что может затруднить дифференциальный диагноз с обструктивной азооспермией [15].

Таким образом маркер, позволяющий дифференцировать эти два состояния (обструктивную азооспермию и остановку созревания сперматозоидов), помог бы в прогнозировании успеха хирургических методов экстракции сперматозоидов и консультировании пациентов с мужским бесплодием. Потенциальным источником таких биомаркеров является семенная плазма.

Цель исследования: оценка липидного профиля эякулята у пациентов с остановкой созревания сперматозоидов.

Материалы и методы

Изучен липидомный профиль семенной плазмы 64 пациентов с азооспермией и 24 здоровых мужчин с нормозооспермией в качестве группы контроля. Работа проведена в отделении андрологии и урологии НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В. Кулакова (Москва, Россия) в 2019–2021 годах. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Сеченовского университета (Москва, Россия). Все пациенты дали письменное согласие на участие в исследовании.

В исследуемую группу были включены мужчины старше 18 лет с азооспермией, подтвержденной дважды при анализе семенной жидкости. Критерии исключения: инфекционные заболевания (острые и хронические в стадии обострения), ретроградная эякуляция и анэякуляция. Всем 64 мужчинам была проведена процедура microTESE, которая выполнялась в соответствии со стандартными протоколами, описанными A. A. Dabaja и P. N. Schlegel [16], с последующим патоморфологическим исследованием биоптатов яичка. В данном исследовании оценивали липидомный профиль семенной плазмы мужчин с необструктивной азооспермией, в том числе с гистологией остановки созревания сперматозоидов.

Липиды из семенной плазмы выделяли методом экстракции Фолча. Липидные экстракты и образцы контроля качества анализировали на жидкостном хроматографе по описанной ранее методике авторами [17]. Липиды идентифицировали с использованием R-скрипта Lipid Match¹ по точной массе с помощью базы данных Lipid Maps² и по характерным тандемным масс-спектрам (MC/MC).

Методы статистического анализа. Для статистической обработки результатов использовали скрипты, написанные на языке R³ и программу RStudio⁴ (RStudio PBC, США). Перед исследованием данные были нормированы на медианные значения соответствующих пиков в образцах контроля качества. При сравнении групп «контроль» и «азооспермия с остановкой созревания сперматозоидов» использовали тест Манна-Уитни. Для сравнения липидных профилей эякулята до и после

операции применяли критерий Уилкоксона. Для описания количественных данных использовали медиану (Me) и квартили Q1 и Q3. Величину порогового уровня значимости p принимали равной 0,05.

Выбор переменных для построения диагностических моделей на основе логистической регрессии «контроль»/«остановка созревания сперматозоидов» осуществляли двухступенчатым методом: с использованием дискриминантного анализа ортогональными проекциями проекций переменных на скрытые структуры (OPLS-DA) определяли значения проекций переменных (ПП) и выбирали те, которые удовлетворяли условию $ПП > 1$. Из них переменные отбирали пошагово, опираясь на значение информационного критерия Акаике (ИКА). Когда рост ИКА останавливался, из выбранного набора соединений пошагово исключали те, чьи коэффициенты не отличались статистически значимо от 0 (порог значимости — 0,05). Полученные модели валидировали с использованием кросс-валидации по отдельному объекту.

Результаты

У 25 из 64 пациентов после микродиссекционной биопсии яичка были обнаружены сперматозоиды. У 14 из 64 пациентов была патоморфологическая картина остановки созревания сперматозоидов и у всех оказался отрицательный исход microTESE.

При сравнении группы контроля и группы с остановкой созревания сперматозоидов были выбраны как статистически значимые 22 липида в режиме положительных ионов (табл. 1) и 11 липидов в режиме отрицательных ионов (табл. 2). Липиды относятся преимущественно к классам гексозилцерамидов, сфингомиелинов и фосфотидилхолинов — простых эфиров и окисленных липидов.

Были построены диагностические модели на основе логистической регрессии для определения остановки созревания сперматозоидов в режиме положительных и отрицательных ионов (табл. 3–4, рис. 1).

Модель в режиме положительных ионов по результатам кросс-валидации обладала более благоприятными прогностическими характеристиками, а именно хорошей чувствительностью (91%) и удовлетвори-

¹Sud M, Fahy E, Cotter D, Brown A, Dennis EA, Glass CK, Merrill AH Jr, Murphy RC, Raetz CR, Russell DW, Subramaniam S. LMSD: LIPID MAPS structure database. Nucleic

²Team, R. C. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available online: <https://www.r-project.org/>

³Team, R. RStudio: Integrated Development for R. Available online: <http://www.rstudio.com/>

⁴ Team, R. RStudio: Integrated Development for R. Available online: <http://www.rstudio.com/>

Таблица 1. Уровни липидов со статистически значимой разницей в уровнях между группой контроля и группой с остановкой созревания, зарегистрированные в режиме положительных ионов

Table 1. Lipid levels with a statistically significant difference in levels between the control group and the maturing group, recorded in the positive-ion mode

Липиды <i>Lipids</i>	Контроль <i>Control group</i> (n = 24)	Остановка созревания <i>Sperm maturation arrest</i> (n = 14)	p
Cer-NS d18:2/18:2	1,73e+06 (1,22e+06;2,44e+06)	2,44e+06 (2,22e+06;2,98e+06)	0,02
DG 18:0_20:0	1,88e+05 (1,35e+05;2,29e+05)	2,75e+05 (2,43e+05;3,31e+05)	0,001
HexCer-NDS d18:0/22:0	7,4e+05 (5,64e+05;8,51e+05)	9,9e+05 (7,06e+05;1,83e+06)	0,05
HexCer-NDS d18:0/24:0	4,39e+06 (3,06e+06;5,17e+06)	5,32e+06 (4,55e+06;8,08e+06)	0,02
HexCer-NS d18:1/24:1	4,11e+04 (2,81e+04;6,23e+04)	7,71e+04 (3,89e+04;1,03e+05)	0,03
HexCer-NS d18:2/24:2	6,34e+05 (4,47e+05;8,79e+05)	8,38e+05 (6,93e+05;1,01e+06)	0,04
LPC 18:0	8,15e+05 (6,5e+05;1,16e+06)	1,37e+06 (8,08e+05;1,67e+06)	0,04
OxTG 16:1_16:1_16:1 (OH)	8,64e+04 (6,52e+04;9,9e+04)	1,05e+05 (9,02e+04;1,44e+05)	0,03
PC 16:0_22:6	7,7e+05 (4,78e+05;1,13e+06)	1,65e+05 (1,14e+05;2,47e+05)	<0,001
PE 20:0_20:5	5,02e+05 (4,05e+05;5,94e+05)	6,35e+05 (5,51e+05;7,06e+05)	0,02
SM d16:1/18:0	6,58e+07 (5,89e+07;7,92e+07)	8,43e+07 (7,02e+07;1,04e+08)	0,02
SM d16:1/22:0	8,46e+05 (6,71e+05;1,2e+06)	1,37e+06 (1,19e+06;1,51e+06)	0,03
SM d18:0/20:0	1,76e+06 (1,43e+06;2,4e+06)	3,31e+06 (2,55e+06;4,61e+06)	<0,001
SM d18:1/16:1	4,21e+05 (3,76e+05;5,13e+05)	4,93e+05 (4,41e+05;6,96e+05)	0,04
SM d18:1/22:0	1,93e+07 (1,63e+07;2,23e+07)	2,79e+07 (1,8e+07;3,78e+07)	0,04
SM d18:1/22:2	2,22e+05 (1,36e+05;2,9e+05)	3,04e+05 (2,62e+05;4,78e+05)	0,02
SM d18:1/24:0	1,67e+07 (1,36e+07;1,92e+07)	2,04e+07 (1,79e+07;2,22e+07)	0,02
SM d18:1/24:1	8,31e+06 (6,27e+06;9,09e+06)	1,04e+07 (7,57e+06;1,32e+07)	0,03
SM d20:1/14:0	5,52e+05 (4,86e+05;6,72e+05)	7,54e+05 (6,66e+05;8,49e+05)	0,01
SM d20:1/22:2	1,29e+06 (9,87e+05;1,45e+06)	1,9e+06 (1,45e+06;2,58e+06)	0,004
TG 14:1_16:0_18:3	8,46e+06 (7,03e+06;1,12e+07)	1,17e+07 (8,29e+06;1,45e+07)	0,04
TG 14:1_16:1_18:2	3,12e+06 (2,66e+06;3,66e+06)	3,81e+06 (3,39e+06;4,15e+06)	0,02

Таблица 2. Уровни липидов со статистически значимой разницей в уровнях между группой контроля и группой с остановкой созревания, зарегистрированные в режиме отрицательных ионов

Table 2. Lipid levels with a statistically significant difference in levels between the control group and the maturing group, recorded in the negative-ion mode

Липиды <i>Lipids</i>	Контроль <i>Control group</i> (n = 24)	Остановка созревания <i>Sperm maturation arrest</i> (n = 14)	p
Cer-AS d24:1/16:1	7,47e+04 (6,37e+04;9,21e+04)	9,8e+04 (7,87e+04;1,43e+05)	0,05
CL 20:4_22:6_22:6_22:6	7,78e+04 (7,05e+04;9,01e+04)	9,81e+04 (8,65e+04;1,14e+05)	0,02
OxPG 16:0_18:0 (1O)	7,8e+04 (6,39e+04;9,46e+04)	1,07e+05 (7,95e+04;1,48e+05)	0,03
OxPS 16:0_18:2 (2O)	2,95e+04 (2,51e+04;3,53e+04)	2,39e+04 (1,88e+04;2,81e+04)	0,04
OxPS 18:1_18:1 (2O)	4,46e+04 (4,03e+04;5,15e+04)	3,57e+04 (2,7e+04;3,97e+04)	0,01
PC 16:1_18:1	1,66e+05 (1,16e+05;2,05e+05)	2,34e+05 (1,77e+05;2,9e+05)	0,04
PG 20:3_22:6	1,77e+05 (7,28e+04;2,04e+05)	3,39e+05 (1,76e+05;4,53e+05)	0,002
PC O-16:0/24:0	5,86e+04 (4,9e+04;7,89e+04)	9,87e+04 (7,11e+04;1,13e+05)	0,003
PC O-16:1/16:0	9,13e+04 (7,85e+04;1,12e+05)	5,96e+04 (5,6e+04;7,48e+04)	0,01
PC O-22:0/18:1	7,84e+04 (5,62e+04;8,86e+04)	9,1e+04 (7,49e+04;1,04e+05)	0,04
PC P-16:0/22:0	2,45e+05 (1,7e+05;2,87e+05)	2,98e+05 (2,61e+05;4,36e+05)	0,02

Таблица 3. Соединения, использовавшиеся для построения модели диагностики остановки созревания в режиме положительных ионов

Table 3. Compounds used to build a model for the diagnosis of sperm maturation arrest in the positive-ion mode

Переменная Variable	β	ДИ (β) CI (β)	ОШ OR	ДИ ОШ CI OR	Z Wald's test	P
Свободный член Intercept term	-4,54	-8,11 – -2,10			-3,06	0,002
PC 16:0_22:6	-0,73	-1,42 – -0,272E-06	0,48	0,24 – 0,76	-2,58	0,01
SM d20:1/22:2	4,96	2,29 – 9,13	142,31	9,90 – 9,22 [^] 103	2,93	0,003

Примечание: β – коэффициент β ; ДИ – доверительный интервал; ОШ – отношение шансов; ДИ ОШ – доверительный интервал отношения шансов; Z – критерий Вальда; P – вероятность равенства коэффициента 0.

Note: β – β coefficient; CI – confidence interval; OR – odds ratio; CI OR – the confidence interval of the odds ratio; Z – Wald's test; P – the probability of the coefficient is equal to 0.

Таблица 4. Соединения, использовавшиеся для построения модели диагностики остановки созревания в режиме отрицательных ионов

Table 4. Compounds used to build a model for the diagnosis of sperm maturation arrest in the negative-ion mode

Переменная Variable	β	ДИ (β) CI (β)	ОШ OR	ДИ ОШ CI OR	Z Wald's test	P
Свободный член Intercept term	-1,24	-3,45 – 0,78			-1,19	0,23
PG 20:3_22:6	2,52	1,13 – 4,49	12,37	3,10 – 89,27	3,02	0,002
PC O-16:1/16:0	-1,96	-4,12 – 0,27	0,14	0,02 – 0,76	-2,05	0,04

Примечание: β – коэффициент β ; ДИ – доверительный интервал; ОШ – отношение шансов; ДИ ОШ – доверительный интервал отношения шансов; Z – критерий Вальда; P – вероятность равенства коэффициента 0.

Note: β – β coefficient; CI – confidence interval; OR – odds ratio; CI OR – the confidence interval of the odds ratio; Z – Wald's test; P – the probability of the coefficient is equal to 0.

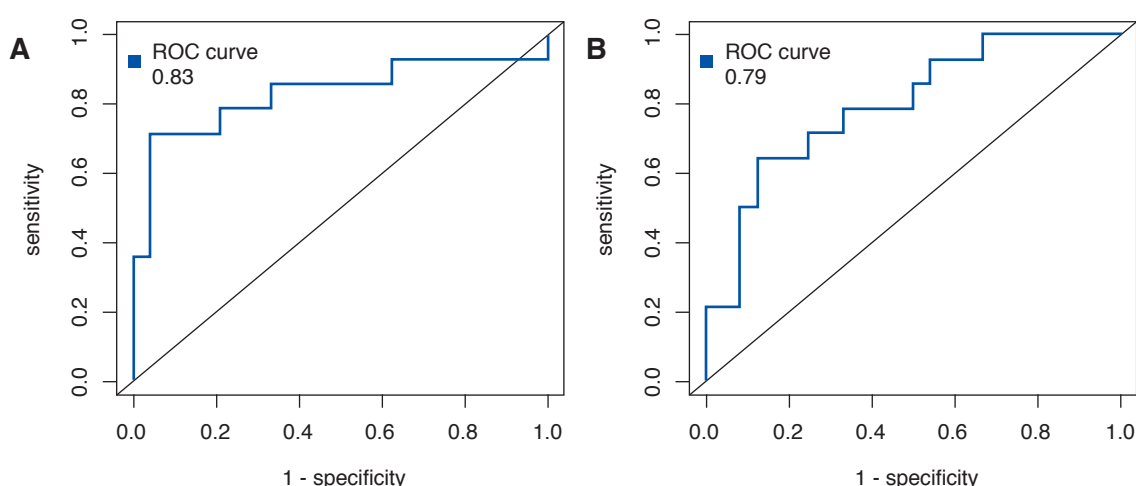


Рисунок 1. ROC-кривые, построенные в ходе кросс-валидации моделей для соединений с разной концентрацией в группе контроля и группе остановки созревания сперматозоидов в режиме положительных (A) и отрицательных (B) ионов. На рисунках приведены значения площади под операционной кривой

Figure 1. ROC curves constructed during cross-validation of models for compounds with different concentrations in the control group and the sperm maturation arrest group (positive-ion (A) and negative-ion (B) modes). The figures show the values of the area under the operating curve

тельной специфичностью (85%). В режиме отрицательных ионов по результатам кросс-валидации модель обладала менее благоприятными прогностическими характеристиками, а именно удовлетворительной чувствительностью (75%) и специфичностью (81%).

Обсуждение

При консультировании по поводу бесплодия для пациентов с необструктивной азооспермией важно предоставить информацию о шансах получения сперматозоидов. Неудачная процедура *microTESE*, особенно при одновременном заборе яйцеклетки, может иметь непоправимые эмоциональные и финансовые последствия для обоих членов семейной пары [18]. В соответствии с более ранними исследованиями использование гистопатологических паттернов можно рассматривать как ценный предиктор экстракции сперматозоидов [15, 19, 20].

В нашем исследовании мы оценивали липидомный профиль эякулята у пациентов с остановкой созревания сперматозоидов. Нам удалось найти липиды-кандидаты, в том числе *PC 16:0_22:6*, *PC O-16:1/16:0*, *SM d20:1/22:2* и *PG 20:3_22:6*, относящиеся к классам фосфотидилхолинов, сфингомиелинов (фосфолипиды) и фосфатидилглицеринов, которые при многофакторном анализе оказались статистически значимыми предикторами необструктивной азооспермии с остановкой созревания сперматозоидов.

F. Sicchieri et al. выявили, что при размораживании криоконсервированных сперматозоидов их общая подвижность значительно увеличилась после обработки α -фосфатидилхолином и L-ацетил-карнитином [21]. Также A. A. Vireque et al. в своём исследовании продемонстрировали, что α -фосфатидилхолин *in vitro* улучшает качество сперматозоидов [22]. M. Voguenet et al. проанализировали метаболомный профиль семенной плазмы 20 мужчин с тяжёлой олигоастенозооспермией и сравнили их с 20 мужчинами с нормозооспермией, выявив снижение концентраций 17 фосфатидилхолинов и 4 сфингомиелинов в группе с тяжёлой олигоастенозооспермией [23].

Сфингомиелины являются компонентами простасом, которые при слиянии со сперматозоидами стабилизируют их плазматическую мембрану, обогащая её холестерином, сфингомиелином и насыщенным глицерофосфолипидом. Это предотвращает преждевременное

возникновение акросомной реакции [24]. R. Rivera-Egea et al. проанализировали липидный состав сперматозоидов от бесплодных пациентов после интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов (группа незабеременевших (n = 16) по сравнению с группой забеременевших (n = 22)) и обнаружили 151 различных липидов в образцах, 10 из которых были значительно увеличены в образцах из группы незабеременевших, в пределах от 1,10 до 1,30 раза. В первую очередь это были церамиды, сфингомиелины и три глицерофосфолипида, один лизофосфатидилхолин и два вида плазмалогенов [25].

Обсуждая недостатки исследования, мы не можем не затронуть выбор контрольной группы. Нормозооспермия явно будет отличаться от любой азооспермии по метаболомному профилю ввиду отсутствия сперматозоидов. Это и является недостатком нашей работы. Мы решили, что использовать obstructивную азооспермию в качестве группы контроля мы не можем, ввиду того что липидом будет зависеть от уровня обструкции. С учётом гетерогенность необструктивной азооспермии эта группа также не подходит. Использовать отдельные подвиды obstructивной азооспермии в качестве группы сравнения тоже сомнительно, так как метаболомный профиль ранее у них подробно не описывался. Это исследование является первым из такой серии. Нами было принято решение использовать в качестве контрольной группы нормозооспермию. Искажение результатов из-за влияния зрелых сперматозоидов мы нивелировали, исследуя отделённую от них семенную плазму. В будущем нами планируется сравнение метаболомного профиля семенной плазмы подвидов obstructивной азооспермии.

Заключение

Несмотря на то, что и у фертильных мужчин, и у мужчин с гомогенной остановкой созревания сперматозоидов в равной мере сохранены ранние этапы сперматогенеза, эякулят у исследуемой группы пациентов отличается по своему липидному профилю. Пациенты с obstructивной азооспермией, в частности на фоне остановки мейоза, могут иметь уникальные липидомные характеристики семенной плазмы, которые, возможно, в будущем позволят дифференцировать различные варианты тяжёлого мужского бесплодия с помощью неинвазивных методов.

ЛИТЕРАТУРА

REFERENCES

- 1 Jarow JP, Espeland MA, Lipshultz LI. Evaluation of the azoospermic patient. *J Urol.* 1989;142 (1):62–5. DOI: 10.1016/s0022-5347 (17)38662-7.
- 2 Esteves SC. Clinical management of infertile men with non-obstructive azoospermia. *Asian J Androl.* 2015;17 (3):459–70. DOI: 10.4103/1008-682X.148719.
- 3 Schlegel PN, Palermo GD, Goldstein M, Menendez S, Zaninovic N, Veeck LL, Rosenwaks Z. Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for nonobstructive azoospermia. *Urology.* 1997;49 (3):435–40. DOI: 10.1016/S0090-4295 (97)00032-0.
- 4 Nicopoullou JD, Gilling-Smith C, Almeida PA, Norman-Taylor J, Grace I, Ramsay JW. 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.
- 5 Hung AJ, King P, Schlegel PN. Uniform testicular maturation arrest: a unique subset of men with nonobstructive azoospermia. *J Urol.* 2007;178 (2):608–12; discussion 612. DOI: 10.1016/j.juro.2007.03.125.
- 6 Kim ED, Leibman BB, Grinblat DM, Lipshultz LI. Varicocele repair improves semen parameters in azoospermic men with spermatogenic failure. *J Urol.* 1999;162 (3 Pt 1):737–40. DOI: 10.1097/00005392-199909010-00031.
- 7 Kadioglu A, Tefekli A, Cayan S, Kandirali E, Erdemir F, Tellaloglu S. Microsurgical inguinal varicocele repair in azoospermic men. *Urology.* 2001;57 (2):328–33. DOI: 10.1016/s0090-4295 (00)00908-0.
- 8 Ishikawa T, Fujioka H, Fujisawa M. Clinical and hormonal findings in testicular maturation arrest. *BJU Int.* 2004;94 (9):1314–6. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2004.05163.x.
- 9 Micic S. The effect of the gametogenesis on serum FSH, LH and prolactin levels in infertile men. *Acta Eur Fertil.* 1983;14 (5):337–40. PMID: 6424374.
- 10 Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev.* 2001;22 (2):226–39. DOI: 10.1210/edrv.22.2.0425.
- 11 Gonsalves J, Sun F, Schlegel PN, Turek PJ, Hopps CV, Greene C, Martin RH, Pera RA. Defective recombination in infertile men. *Hum Mol Genet.* 2004;13 (22):2875–83. DOI: 10.1093/hmg/ddh302.
- 12 Ferrás C, Fernandes S, Marques CJ, Carvalho F, Alves C, Silva J, Sousa M, Barros A. AZF and DAZ gene copy-specific deletion analysis in maturation arrest and Sertoli cell-only syndrome. *Mol Hum Reprod.* 2004;10 (10):755–61. DOI: 10.1093/molehr/gah104.
- 13 Esteves SC, Prudencio C, Seol B, Verza S, Knoedler C, Agarwal A. Comparison of sperm retrieval and reproductive outcome in azoospermic men with testicular failure and obstructive azoospermia treated for infertility. *Asian J Androl.* 2014;16 (4):602–6. DOI: 10.4103/1008-682X.126015.
- 14 Schoor RA, Elhanbly S, Niederberger CS, Ross LS. The role of testicular biopsy in the modern management of male infertility. *J Urol.* 2002;167 (1):197–200. PMID: 11743304.
- 15 Weedin JW, Bennett RC, Fenig DM, Lamb DJ, Lipshultz LI. Early versus late maturation arrest: reproductive outcomes of testicular failure. *J Urol.* 2011;186 (2):621–6. DOI: 10.1016/j.juro.2011.03.156.
- 16 Dabaja AA, Schlegel PN. Microdissection testicular sperm extraction: an update. *Asian J Androl.* 2013;15 (1):35–9. DOI: 10.1038/aja.2012.141.

- 17 Chagovets V, Wang Z, Kononikhin A, Starodubtseva N, Borisova A, Salimova D, Popov I, Kozachenko A, Chinging K, Chen H, Frankevich V, Adamyan L, Sukhikh G. A Comparison of Tissue Spray and Lipid Extract Direct Injection Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Differentiation of Eutopic and Ectopic Endometrial Tissues. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2018;29 (2):323–330. DOI: 10.1007/s13361-017-1792-y.
- 18 Ezech UI, Taub NA, Moore HD, Cooke ID. Establishment of predictive variables associated with testicular sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 1999;14 (4):1005–12. DOI: 10.1093/humrep/14.4.1005.
- 19 Seo JT, Ko WJ. Predictive factors of successful testicular sperm recovery in non-obstructive azoospermia patients. *Int J Androl.* 2001;24 (5):306–10. DOI: 10.1046/j.1365-2605.2001.00307.x.
- 20 Yang J, Liu JH, Zou XF, Yuan YH, Xiao RH, Wu GQ, Wang XN, Wu YT, Long DZ, Liu FL, Liu M, Xu H. [Sperm retrieval and the predictive parameter of non-obstructive azoospermia: a meta-analysis of literatures 1990 to 2008]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2008;88 (30):2131–5. (In Chinese). PMID: 19080475.
- 21 Sicchieri F, Silva AB, Santana VP, Vasconcelos MAC, Ferriani RA, Vireque AA, Dos Reis RM. Phosphatidylcholine and L-acetyl-carnitine-based freezing medium can replace egg yolk and preserves human sperm function. *Transl Androl Urol.* 2021;10 (1):397–407. DOI: 10.21037/tau-20-1004.
- 22 Vireque AA, Tata A, Silva OF, LoTurco EG, Azzolini A, Ferreira CR, Dantas MH, Ferriani RA, Reis RM. Effects of n-6 and n-3 polyunsaturated acid-rich soybean phosphatidylcholine on membrane lipid profile and cryotolerance of human sperm. *Fertil Steril.* 2016;106 (2):273–283.e6. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.03.044.
- 23 Bogueuet M, Bocca C, Bouet PE, Serri O, Chupin S, Tessier L, Blanchet O, El Hachem H, Chao de la Barca JM, Reynier P, May-Panloup P. Metabolomic signature of the seminal plasma in men with severe oligoasthenospermia. *Andrology.* 2020;8 (6):1859–1866. DOI: 10.1111/andr.12882.
- 24 Arienti G, Carlini E, Polci A, Cosmi EV, Palmerini CA. Fatty acid pattern of human prostatesome lipid. *Arch Biochem Biophys.* 1998;358 (2):391–5. DOI: 10.1006/abbi.1998.0876.
- 25 Rivera-Egea R, Garrido N, Sota N, Meseguer M, Remohí J, Dominguez F. Sperm lipidic profiles differ significantly between ejaculates resulting in pregnancy or not following intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35 (11):1973–1985. DOI: 10.1007/s10815-018-1284-4.
- 17 Chagovets V, Wang Z, Kononikhin A, Starodubtseva N, Borisova A, Salimova D, Popov I, Kozachenko A, Chinging K, Chen H, Frankevich V, Adamyan L, Sukhikh G. A Comparison of Tissue Spray and Lipid Extract Direct Injection Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Differentiation of Eutopic and Ectopic Endometrial Tissues. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2018;29 (2):323–330. DOI: 10.1007/s13361-017-1792-y.
- 18 Ezech UI, Taub NA, Moore HD, Cooke ID. Establishment of predictive variables associated with testicular sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 1999;14 (4):1005–12. DOI: 10.1093/humrep/14.4.1005.
- 19 Seo JT, Ko WJ. Predictive factors of successful testicular sperm recovery in non-obstructive azoospermia patients. *Int J Androl.* 2001;24 (5):306–10. DOI: 10.1046/j.1365-2605.2001.00307.x.
- 20 Yang J, Liu JH, Zou XF, Yuan YH, Xiao RH, Wu GQ, Wang XN, Wu YT, Long DZ, Liu FL, Liu M, Xu H. [Sperm retrieval and the predictive parameter of non-obstructive azoospermia: a meta-analysis of literatures 1990 to 2008]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2008;88 (30):2131–5. (In Chinese). PMID: 19080475.
- 21 Sicchieri F, Silva AB, Santana VP, Vasconcelos MAC, Ferriani RA, Vireque AA, Dos Reis RM. Phosphatidylcholine and L-acetyl-carnitine-based freezing medium can replace egg yolk and preserves human sperm function. *Transl Androl Urol.* 2021;10 (1):397–407. DOI: 10.21037/tau-20-1004.
- 22 Vireque AA, Tata A, Silva OF, LoTurco EG, Azzolini A, Ferreira CR, Dantas MH, Ferriani RA, Reis RM. Effects of n-6 and n-3 polyunsaturated acid-rich soybean phosphatidylcholine on membrane lipid profile and cryotolerance of human sperm. *Fertil Steril.* 2016;106 (2):273–283.e6. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.03.044.
- 23 Bogueuet M, Bocca C, Bouet PE, Serri O, Chupin S, Tessier L, Blanchet O, El Hachem H, Chao de la Barca JM, Reynier P, May-Panloup P. Metabolomic signature of the seminal plasma in men with severe oligoasthenospermia. *Andrology.* 2020;8 (6):1859–1866. DOI: 10.1111/andr.12882.
- 24 Arienti G, Carlini E, Polci A, Cosmi EV, Palmerini CA. Fatty acid pattern of human prostatesome lipid. *Arch Biochem Biophys.* 1998;358 (2):391–5. DOI: 10.1006/abbi.1998.0876.
- 25 Rivera-Egea R, Garrido N, Sota N, Meseguer M, Remohí J, Dominguez F. Sperm lipidic profiles differ significantly between ejaculates resulting in pregnancy or not following intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35 (11):1973–1985. DOI: 10.1007/s10815-018-1284-4.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Сафар Исраилович Гамидов — доктор медицинских наук, профессор; руководитель отделения андрологии и урологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России; профессор кафедры акушерства, гинекологии, перинатологии и репродуктологии Института последипломного образования ФГАУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет)
г. Москва, Россия
<https://orcid.org/0000-0002-9128-2714>
e-mail: safargamidov@yandex.ru

Тарас Валерьевич Шатылко — кандидат медицинских наук; врач-уролог отделения андрологии и урологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России
г. Москва, Россия
<https://orcid.org/0000-0002-3902-9236>
e-mail: dialectic.law@gmail.com

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Safar I. Gamidov — M.D., Dr.Sc. (Med), Full Prof.; Head, Andrology and Urology Division. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology; Prof., Dept. of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Institute of Postgraduate Education, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University);
Moscow, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0002-9128-2714>
e-mail: safargamidov@yandex.ru

Taras V. Shatylo — M.D., Cand.Sc. (Med); Urologist, Andrology and Urology Division. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology
Moscow, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0002-3902-9236>
e-mail: dialectic.law@gmail.com

Алихан Халитович Тамбиев — аспирант кафедры акушерства, гинекологии, перинатологии и репродуктологии Института последипломного образования ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет)
г. Москва, Россия
<https://orcid.org/0000-0001-8151-0077>
e-mail: dr.tambiev@gmail.com

Алиса Олеговна Токарева — сотрудник лаборатории протеомики и метаболомики репродукции человека ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России
г. Москва, Россия
<https://orcid.org/0000-0001-5918-9045>
e-mail: alisa.tokareva@phystech.edu

Виталий Викторович Чаговец — кандидат физико-математических наук; старший научный сотрудник лаборатории протеомики и метаболомики репродукции человека ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России
г. Москва, Россия
<https://orcid.org/0000-0002-5120-376X>
e-mail: vvchagovets@gmail.com

Тимур Борисович Бицоев — аспирант кафедры акушерства, гинекологии, перинатологии и репродуктологии Института последипломного образования ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет)
г. Москва, Россия
<https://orcid.org/0000-0002-9690-6338>
e-mail: 6646362@mail.ru

Наталья Леонидовна Стародубцева — кандидат биологических наук; заведующая лабораторией протеомики и метаболомики репродукции человека ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России
г. Москва, Россия
<https://orcid.org/0000-0001-6650-5915>
e-mail: n_starodubtseva@oparina4.com

Алина Юрьевна Попова — кандидат медицинских наук; старший научный сотрудник отделения андрологии и урологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России
г. Москва, Россия
<https://orcid.org/0000-0003-1163-5602>
e-mail: alina-dock@yandex.ru

Владимир Евгеньевич Франкевич — кандидат физико-математических наук; заведующий отделом системной биологии в репродукции ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России
г. Москва, Россия
<https://orcid.org/0000-0002-9780-4579>
e-mail: v_frankevich@oparina4.ru

Alikhan Kh. Tambiev — M.D.; Postgraduate Student. Dept. of Obstetrics, Gynecology, Perinatology, and Reproductology, Institute of Postgraduate Education, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)
Moscow, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0001-8151-0077>
e-mail: dr.tambiev@gmail.com

Alisa O. Tokareva — Researcher, Proteomics and Metabolomics Laboratory of Human Reproduction, Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology
Moscow, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0001-5918-9045>
e-mail: alisa.tokareva@phystech.edu

Vitaliy V. Chagovets — Cand.Sc. (Phys-Math); Senior Researcher, Proteomics and Metabolomics Laboratory of Human Reproduction, Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology
Moscow, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0002-5120-376X>
e-mail: vvchagovets@gmail.com

Timur B. Bitsoev — M.D.; Postgraduate Student. Dept. of Obstetrics, Gynecology, Perinatology, and Reproductology, Institute of Postgraduate Education, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)
Moscow, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0002-9690-6338>
e-mail: 6646362@mail.ru

Natalia L. Starodubtseva — Cand.Sc. (Biol); Head, Proteomics, and Metabolomics Laboratory of Human Reproduction, Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology
Moscow, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0001-6650-5915>
e-mail: n_starodubtseva@oparina4.com

Alina Yu. Popova — M.D., Cand.Sc. (Med); Senior Researcher, Andrology and Urology Division, Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology
Moscow, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0003-1163-5602>
e-mail: alina-dock@yandex.ru

Vladimir E. Frankevich — Cand.Sc. (Phys-Math); Head, Division of System Biology in Reproduction, Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology
Moscow, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0002-9780-4579>
e-mail: v_frankevich@oparina4.ru