



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/48 (2024.08); G01N 1/28 (2024.08)

(21)(22) Заявка: 2024113839, 22.05.2024

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.05.2024

Дата регистрации:
26.11.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.05.2024

(45) Опубликовано: 26.11.2024 Бюл. № 33

Адрес для переписки:

117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6,
ФГАОУ ВО РУДН, Костин Андрей
Александрович

(72) Автор(ы):

Кульченко Нина Геннадьевна (RU),
Фаниев Михаил Владимирович (RU),
Атякшин Дмитрий Андреевич (RU),
Кадыров Зиёратшо Абдуллоевич (RU),
Гущина Юлия Шамилевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Российский университет
дружбы народов имени Патриса Лумумбы"
(РУДН) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2819094 C1, 14.05.2024. RU
2665162 C1, 28.08.2018. US 20130115638 A1,
09.05.2013. КУЛЬЧЕНКО Н.Г.

Прогнозирование успеха вспомогательных
репродуктивных технологий с помощью
оценки морфологии яичка. Исследования и
практика в медицине. 2018; 5(4): 18-25.
КУЛЬЧЕНКО Н.Г. Популяция тучных клеток
в яичке при патоспермии. РМЖ. Медицинское
обозрение. (см. прод.)

(54) Способ определения необходимости выполнения вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) с донацией сперматозоидов при обструктивном мужском бесплодии

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к урологии, андрологии, репродуктологии, клинической лабораторной диагностике, и может быть использовано для определения необходимости выполнения программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) с донацией сперматозоидов у мужчин обструктивной азооспермией. Для этого у мужчин с обструкцией репродуктивных путей получают биопсийный материал яичка. Затем на гистологическом срезе поперечных сечений извитых семенных канальцев исследуют методом световой микроскопии состояние сперматогенеза

по десятибалльной шкале. Далее исследуют интерстиций яичка и наличие в нем триптаза-позитивных тучных клеток в 1 мм², которые контрастируют с помощью иммуногистохимического окрашивания. При показателе количества триптаза-позитивных тучных клеток 23 и более в 1 мм² в интерстиции яичка на фоне нарушения сперматогенеза 6 баллов и ниже определяют необходимость выполнения протокола вспомогательных репродуктивных технологий с донацией сперматозоидов. Изобретение позволяет

определить успешность программ ВРТ при обструктивной азооспермии, тем самым принять своевременные меры к осуществлению повторного протокола вспомогательных

репродуктивных технологий с использованием аутоспермиев или донацией половых клеток, тем самым сокращая количество безрезультатных попыток ВРТ. 3 пр.

(56) (продолжение):

2022;6(4):195-199. ANDRADE D.L. et al. Differential Diagnosis of Azoospermia in Men with Infertility. J. Clin. Med. 2021, 10, 3144. NISTAL M., et al. Testicular biopsy in patients with obstructive azoospermia. Am J Surg Pathol. 1999 Dec;23(12):1546-54.

RU 2830702 C1

RU 2830702 C1

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

G01N 33/48 (2024.08); G01N 1/28 (2024.08)

(21)(22) Application: 2024113839, 22.05.2024

(24) Effective date for property rights:
22.05.2024Registration date:
26.11.2024

Priority:

(22) Date of filing: 22.05.2024

(45) Date of publication: 26.11.2024 Bull. № 33

Mail address:

117198, Moskva, ul. Miklukho-Maklaya, 6,
FGAOU VO RUDN, Kostin Andrej
Aleksandrovich

(72) Inventor(s):

Kulchenko Nina Gennadevna (RU),
Faniev Mikhail Vladimirovich (RU),
Atiakshin Dmitrii Andreevich (RU),
Kadyrov Zieratsho Abdulloevich (RU),
Gushchina Iuliia Shamilevna (RU)

(73) Proprietor(s):

Federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia «Rossiiskii universitet družby
narodov imeni Patrisa Lumumby» (RUDN)
(RU)(54) METHOD FOR DETERMINING NEED FOR ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES (ART)
WITH SPERM DONATION IN OBSTRUCTIVE MALE INFERTILITY

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, namely to urology, andrology, reproductology, clinical laboratory diagnostics, and can be used to determine the need for assisted reproductive technology (ART) programs with sperm donation in males with obstructive azoospermia. For this purpose, testicular biopsy material is obtained in males with reproductive tract obstruction. Then, spermatogenesis state is examined by light microscopy on a histological section of cross sections of convoluted seminiferous tubules on a ten-point scale. Further, testicular interstitium and presence of tryptase-positive mast cells in 1 mm², which are contrasted by means of immunohistochemical staining, are examined.

If the value of tryptase-positive mast cells is 23 and more in 1 mm² in the interstitium of the testicle with underlying spermatogenesis disorder of 6 points and below, the need to perform a protocol of assisted reproductive technologies with sperm donation is determined.

EFFECT: invention enables to determine the success of ART programs in obstructive azoospermia, thus to take timely measures for implementation of repeated protocol of assisted reproductive technologies using autospemia or donation of germ cells, thereby reducing the number of unsuccessful attempts of ART.

1 cl, 3 ex

Настоящее изобретение относится к медицине, а именно к урологии, андрологии, репродуктологии, клинической лабораторной диагностике, и может быть использовано для прогнозирования необходимости донации сперматозоидов при выполнении программ вспомогательных технологий (ВРТ) у мужчин собструктивной азооспермией.

5 В настоящее время мужское бесплодие является актуальной медицинской и социальной проблемами большинства стран, испытывающих демографический кризис. Во всем мире среди лиц мужского пола мужское бесплодие встречается у 5-7% (Kyrgiafini MA, Mamuris Z. Male Infertility: From Genes to Genomes 2022. Genes (Basel). 2023 Apr 23;14(5): 959. doi: 10.3390/genes14050959). Доля мужского фактора бесплодия среди супружеских
10 пар уже достигает 50%, что требует пристального внимания к мужскому здоровью (Minhas S, Bettocchi C, Boeri L. et al. European Association of Urology Guidelines on Male Sexual and Reproductive Health: 2021 Update on Male Infertility. Eur Urol. 2021 Nov;80(5):603-620. doi: 10.1016/j.eururo.2021.08.014).

Различные факторы внешней и внутренней среды могут способствовать нарушению
15 выработки сперматозоидов, их подвижности, морфологии. Наиболее тяжелой формой нарушения сперматогенеза является азооспермия, которая встречается у 10-15% бесплодных мужчин (Яманди Т.А., Акуленко Л.В., Сафина Н.Ю., Витязева И.И., Боголюбов С.В., Мельник Я.И., Касатонина Е.В., Поляков А.В., Андреева М.В., Черных В.Б. Анализ потенциала фертильности мужчин с азооспермией и олигозооспермией
20 тяжелой степени различной этиологии. Андрология и генитальная хирургия. 2018;19(3):60-69. <https://doi.org/10.17650/2070-9781-2018-19-3-60-69>).

Обструктивная форма азооспермии встречается в 40% случаев у бесплодных мужчин (Wang Z, Wang X, Song C, Lu F, Zhai J, Li N, Jiang B, Tan S, Xuan X. The pregnancy outcomes in patients with epididymal obstructive azoospermia after microsurgical vasoepididymostomy: a
25 systematic review and meta-analysis. Front Med (Lausanne). 2023 May 18;10:1186729. doi: 10.3389/fmed.2023.1186729). Обструктивная азооспермия сопровождается обструкцией репродуктивных путей, включая семявыносящие протоки, придатки яичка и семявыбрасывающий проток. Наиболее распространенными причинами обструктивной азооспермии являются врожденные аномалии, генетические мутации, инфекции,
30 предшествующие операции на мошонке или в паховой области и т.д. (Wu X, Lin D, Sun F, Cheng CY. Male Infertility in Humans: An Update on Non-obstructive Azoospermia (NOA) and Obstructive Azoospermia (OA). Adv Exp Med Biol. 2021;1288:161-173. doi: 10.1007/978-3-030-77779-1_8). При этом остается 30% пациентов, у которых причину азооспермии установить не удастся, т.е. констатируется идиопатическая форма азооспермии (Corsini
35 C, Boeri L, Candela L, Pozzi E, Belladelli F, Capogrosso P, Fallara G, Schifano N, Cignoli D, Ventimiglia E, D'Arma A, Alfano M, Montorsi F, Salonia A. Is There a Relevant Clinical Impact in Differentiating Idiopathic versus Unexplained Male Infertility? World J Mens Health. 2023 Apr;41(2):354-362. doi: 10.5534/wjmh.220069), которая является наиболее тяжелой формой патоспермии в плане лечения.

40 Согласно современным рекомендациям если жизнеспособные сперматозоиды не обнаруживаются в эякуляте, то они могут быть извлечены непосредственно из яичек. Для этого в рамках программы ВРТ применяются такие хирургические методы, как экстракция сперматозоидов из яичек (TESE) или микродиссекция (micro-TESE).

Полученные половые клетки могут быть использованы для процедуры
45 экстракорпорального оплодотворения (ЭКО/ИКСИ) (Erdem E, Karacan M, Çebi Z, Uluğ M, Arvas A, Çamlıbel T. Results of intracytoplasmic sperm injection performed with sperm retrieved by microscopic testicular sperm extraction in azoospermic patients. Turk J Urol. 2018 Nov;44(6):462-466. doi: 10.5152/tud.2018.85282).

Если хирургический метод лечения мужского бесплодия путем TESE и micro-TESE оказывается не эффективным, то остается единственный вариант реализации отцовства для конкретного пациента, заключающийся в использовании донорской спермы или усыновлении (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine and the Practice Committee for the Society for Assisted Reproductive Technology. Electronic address: ASRM@asrm.org. Guidance regarding gamete and embryo donation. Fertil Steril. 2021 Jun;115 (6):1395-1410. doi: 10.1016/j.fertnstert.2021.01.045.).

Однако не все мужчины с патоспермией согласны на такой исход программы ВРТ. Большинство пациентов хотят иметь собственного, генетически однородного ребенка, соглашаясь порой на несколько циклов ВРТ. Поэтому необходим поиск критериев сохранности сперматогенеза, для прогнозирования сохранности сперматогенеза конкретного пациента с целью повышения эффективности выполнения программ ВРТ.

В практике для оценки показателей качества спермы в настоящее время выполняется спермограмма [Björndahl L, Kirkman Brown J; other Editorial Board Members of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. The sixth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen: ensuring quality and standardization in basic examination of human ejaculates. Fertil Steril. 2022 Feb;117 (2):246-251. doi: 10.1016/j.fertnstert.2021.12.012]. Данное исследование включает в себя определение целого ряда параметров эякулята, из которых, однако, на практике в диагностике обструктивного бесплодия информативными параметрами будут снижение объема эякулята, повышение рН семенной плазмы (особенно при двусторонней обструкции семявыносящих протоков. При частичной проходимости репродуктивных путей возможно визуализировать олигозооспермию.

Для оценки качества сперматогенеза при обструктивной азооспермии часто специалисты часто используют показатели гормонального профиля. Расчет индекса свободных андрогенов (андрогенного индекса – АИ) выявил устойчивую тенденцию показателей к нижним границам нормы (у каждого пятого мужчины ниже на 70%): среди пациентов с обструктивной азооспермией – $85,1 \pm 20,3\%$ против $111,2 \pm 12,3\%$ в контроле соответственно ($p > 0,05$). [Аляев Ю.Г. Нарушение половой и репродуктивной функции у мужчин / Ю.Г. Аляев, В. А. Григорян, М. Е. Чалый. //М.: Литтера, 2006. – 188 с.]. Средние уровни гонадотропинов выявили склонность к их повышению при обструктивной азооспермии в сравнении с мужчинами с нормозооспермией. Для ФСГ соответствующие показатели составили $4,2 \pm 2,2$ против $3,6 \pm 1,9$ мМЕ/мл соответственно; для ЛГ – $5,3 \pm 3,5$ против $4,5 \pm 1,8$ мМЕ/мл соответственно ($p > 0,05$) (Панасовский Н. Особенности гормональной регуляции репродуктивной функции при обструктивной азооспермии в зависимости от времени заболевания. Danish Scientific Journal. 2020. № 40-1. С. 30-32).

Однако определение гормонального профиля не обладает высокой специфичностью в плане диагностики обструктивной азооспермии.

Для обструктивной азооспермии не характерно изменение размеров яичка. Однако при длительной обструкции и изменении уровня половых гормонов наблюдается уменьшение объема яичка и снижение линейной скорости кровотока в нем, что отражается на качестве сперматогенеза (Громов А.И., Буйлов В.М. Лучевая диагностика и терапия в урологии: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011).

Известен способ дифференциальной диагностики нарушений сперматогенеза, включающий исследование крови инфракрасной спектроскопией и математическую обработку полученных данных, отличающийся тем, что исследуют высушенную

сыворотку крови в виде суспензии в вазелиновом масле методом инфракрасной спектроскопии в области полос излучения $1200-1000\text{ см}^{-1}$, при этом определяют высоты пиков полос поглощения с максимумами 1170 см^{-1} , 1160 см^{-1} , 1150 см^{-1} , 1050 см^{-1} , 1040 см^{-1} , затем вычисляют значение величин отношений высоты пика с максимумом для x - $1160/1150$, для y - $1050/1040$, для z - $1170/1150$, полученное трехмерное распределение точек этой группы при повороте осей x , y и z соответственно на -9° , -28° и -10° проецируют во фронтальную плоскость для получения двухмерных координат (x ; y), после чего дифференциальную диагностику азооспермии проводят в зависимости от расположения точки внутри диагностических эталонных плоских многогранников, границы которых составляют следующие значения (x ; y): $(0,4713; 1,2185) / (0,3639; 1,1148) / (0,3861; 1,0556) / (0,4602; 1,0852)$ для азооспермии с отсутствием сперматогенеза; $(0,4787; 1,237) / (0,4713; 1,0815) / (0,3528; 1,0000) / (0,6343; 1,2407) / (0,4046; 0,9222)$ - для азооспермии с наличием сперматогенеза. (Патент РФ № 2367957, опубл.20.09.2009).

Недостатками данного технического решения являются:

- наличие специального лабораторного оборудования,
- необходимы поправки с учетом колебания уровней гормонов в течение суток,
- трудоемкость математической обработки полученных данных.

Известен способ дифференциальной диагностики криптозооспермии и азооспермии на основании содержания общего белка в спермальной плазме и отсутствия сперматозоидов при проведении морфологического исследования эякулята, определение содержания общего белка на автоматическом биохимическом анализаторе биуретовым методом в образце спермальной плазмы отличающийся тем, что при содержании общего белка менее $22,0\text{ г/л}$ подтверждают азооспермию; при содержании общего белка более или равного $22,0\text{ г/л}$ диагностируют криптозооспермию. (Патент РФ № 2736003, опубл.11.11.2020).

Однако недостатками этого способа определения являются:

- невысокая чувствительность метода ($66,7\%$),
- метод определяет биохимические изменения в семенной плазме и не демонстрирует корреляцию с морфологическими изменениями в яйцках;
- метод возможно выполнять при частичной обструкции репродуктивных путей, т.е. при олигозооспермии. При двусторонней обструкции семявыносящего протока данная методика будет не эффективной.

- трудоемкость и необходимость наличия специальной аппаратуры.

Наиболее близким к заявленному техническому решению является способ оценки состояния сперматогенеза у мужчин с азооспермией путем количественного кариологического анализа незрелых половых клеток (ККА НПК) (Сорокина Т.М., Андреева М.В., Штаут М.И., Черных В.Б., Курило Л.Ф. Оценка состояния сперматогенеза у пациентов с азооспермией или криптозооспермией с помощью метода количественного кариологического анализа незрелых половых клеток. Андрология и генитальная хирургия. 2019;20(1):75-81. <https://doi.org/10.17650/2070-9781-2019-20-1-75-81>). Данный метод позволяет выявить количественное соотношение клеток, находящихся на разных стадиях сперматогенеза. Данный способ принят нами за прототип.

К недостаткам метода ККА НПК относятся:

- эффективен при наличии у пациента криптозооспермии и олигозооспермии;
- не позволяет дать приемлемую интерпретацию причин бесплодия неясного генеза.

Задачей, на решение которой направлено заявляемое изобретение является усовершенствование методики прогнозирования нарушений сперматогенеза при

обструктивной азооспермии для эффективности выполнения программ ВРТ.

Данная задача решается за счет того, что у мужчин с обструктивной азооспермией получают биопсийный материал яичка, в котором на гистологическом срезе поперечных сечений извитых семенных канальцев исследуют методом световой микроскопии состояние сперматогенеза по десятибалльной шкале, далее исследуют интерстиций яичка и наличие в нем триптаза-позитивных тучных клеток в 1 мм^2 , которые контрастируют с помощью иммуногистохимического окрашивания; при показателе количества триптаза-позитивных тучных клеток 23 и более в 1 мм^2 в интерстиции яичка, на фоне нарушения сперматогенеза 6 баллов и ниже определяют необходимость выполнения протокола вспомогательных репродуктивных технологий с донацией сперматозоидов.

Техническим результатом, обеспечиваемым приведенной совокупностью признаков, является повышение точности и достоверности эффективности ВРТ у мужчин с обструктивной азооспермией за счет выявления необходимости донации сперматозоидов или возможности обойтись без донации, путем оценки положительной экстракции тестикулярных сперматозоидов, введения дополнительных процедур цитоморфологического анализа паренхимы и стромы яичка и введения дополнительных критериев оценки результатов.

Известно, что клеточный состав интерстиция яичка имеет важное значение для сперматогенеза, а клетки, окружающие извитой семенной канал, входят в состав гемато-тестикулярного барьера, регулируют его проницаемость. Среди клеток интерстиция яичка (клетки Лейдига, фибробласты, макрофаги, лимфоциты) наименее изученными являются тучные клетки (ТК). В то же время именно ТК принадлежит важная роль в регуляции местного тканевого гомеостаза. С одной стороны, плазмолемма ТК содержит различные рецепторы, которые реагируют воздействия факторов внешней и внутренней среды. С другой стороны, ТК могут с высокой избирательностью секретировать различные медиаторы, цитокины, хемокины для регуляции специфического тканевого микроокружения (Bonnekoh H, 2018, Komi D.E.A., 2020, Namey FK, 2021, Raj S, Unsworth LD. 2023, Atiakshin, D., 2023, Elieh-Ali-Komi, D, 2023).

Роль ТК в патогенезе обструктивной азооспермии до конца не изучена. Полученные данные свидетельствуют, что инфильтрация интерстиция яичка иммунными клетками наблюдалась в 20% биоптатов у бесплодных мужчин с азооспермией, что приводит к оксидативному стрессу, нарушению стероидогенеза, усугублению обструкции семявыносящего протока (Hasan H, Bhushan S, Fijak M, Meinhardt A. Mechanism of Inflammatory Associated Impairment of Sperm Function, Spermatogenesis and Steroidogenesis. Front Endocrinol (Lausanne). 2022 Apr 28;13:897029. doi: 10.3389/fendo.2022.897029). У мужчин с тяжелыми нарушениями сперматогенеза количество ТК увеличивается почти в 3 раза (Meineke V, Frungieri MB, Jessberger B, Vogt H, Mayerhofer A. Human testicular mast cells contain tryptase: increased mast cell number and altered distribution in the testes of infertile men. Fertil Steril. 2000 Aug;74(2):239-44. doi: 10.1016/s0015-0282(00)00626-9.).

В ходе нашего исследования был проведен количественный подсчет триптаза-позитивных тучных клеток в интерстиции яичка и установлена их корреляция с нарушением сперматогенеза у мужчин с обструктивной азооспермией для решения вопроса о необходимости выполнения протокола вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) собственными сперматозоидами, или донора, что позволило получить совокупность признаков для достижения нового технического, которым явилось повышение точности и достоверности эффективности ВРТ у мужчин с обструктивной азооспермией.

Подробное описание способа и примеры его клинического выполнения

Предлагаемый способ прогнозирования осуществляется следующим образом. У мужчин с обструктивной азоосpermией получают биоптат яичка, в котором методом световой микроскопии оценивают состояние сперматогенеза в извитых семенных канальцах в баллах.

Биопсия яичка производится открытым способом по стандартным показаниям по методике Micro-TESE (Franco G, Scarselli F, Casciani V, De Nunzio C, Dente D, Leonardo C, Greco PF, Greco A, Minasi MG, Greco E. A novel stepwise micro-TESE approach in non obstructive azoospermia. BMC Urol. 2016 May 12;16(1):20. doi: 10.1186/s12894-016-0138-6).

После стандартной фиксации в забуференном 4% формальдегиде биопсийный материал заливали в парафин. Иммуногистохимическую детекцию триптазы ТК проводили с помощью антител Anti-Mast Cell Tryptase antibody (клон AA1, #ab2378, разведение 1:2000; Abcam, Великобритания). В качестве вторичных использовались козы антитела #AS-M1-HRP, хромогенная детекция которых проводилась реагентом ImmPACTTM DAB Peroxidase Substrat Kit (#SK-4105) согласно инструкции производителя. После стандартной процедуры обезвоживания срезы заключали в постоянную монтажную среду (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA, #H1000).

Микроскопическое исследование осуществляется с помощью микроскопа «Olympus CX43» при общем увеличении оптической системы $\times 400$. Тучные клетки оценивались в 1 мм^2 интерстиция яичка. Качество сперматогенеза оценивалось на поперечных срезах извитых семенных канальцах в баллах, где 10 баллов – сперматогенез полностью сохранён; 9 – незначительные нарушения сперматогенеза – дезорганизация сперматогенного эпителия, много поздних сперматид; 8 – меньше чем пять сперматозоидов в канальце, немного поздних сперматид; 7 – отсутствие сперматозоидов и поздних сперматид, много ранних сперматид; 6 – отсутствие сперматозоидов и поздних сперматид, мало ранних сперматид; 5 – отсутствие сперматозоидов и сперматид, много сперматоцитов; 4 – отсутствие сперматозоидов и сперматид, мало сперматоцитов; 3 – только сперматогонии; 2 – отсутствие половых клеток, только клетки Сертоли; 1 – отсутствие элементов сперматогенного эпителия (тубулярная атрофия) [Aafjes J.H., van der Vijver J.C., Schenck P.E. Value of a testicular biopsy rating for prognosis in oligozoospermia. Br Med J. 1:289–290., 1978.]

Также в условиях световой микроскопии оценивается интерстиций яичка и наличие в нем триптаза-позитивных тучных клеток (ТК). Отдельно производился морфометрический подсчет ТК в 1 мм^2 интерстиция яичка и определение соотношения их количества с нарушением сперматогенеза. При показателе количества триптаза-позитивных тучных клеток 23 и более в 1 мм^2 в интерстиции яичка на фоне нарушения сперматогенеза 6 баллов и ниже определяют необходимость выполнения протокола вспомогательных репродуктивных технологий с донацией сперматозоидов.

Наши исследования показали, что данный уровень содержания ТК в 1 мм^2 интерстиция яичка свидетельствует о выраженном хроническом воспалении гонады, о малой перспективе восстановления сперматогенного эпителия, низкой эффективности получения собственных сперматозоидов и позволяет прогнозировать необходимость выполнения протокола вспомогательных репродуктивных технологий с донацией сперматозоидов.

Работоспособность заявляемого способа подтверждается следующими клиническими примерами:

Пример 1.

Пациент С-ев, 36 лет. Мужское бесплодие 7 лет. По данным спермограммы и клинического обследования – идиопатическая обструктивная азооспермия. Оценка сперматогенеза – 2–3 балла. Количество триптаза-позитивных тучных клеток – 64 мм² в интерстиции яичка. Морфологически зрелые сперматозоиды при биопсии яичка не были получены. Согласно заявляемому изобретению, при показателе количества триптаза-позитивных тучных клеток 23 и более в 1мм² в интерстиции яичка, на фоне нарушения сперматогенеза 6 баллов и ниже определяют необходимость выполнения протокола вспомогательных репродуктивных технологий с донацией сперматозоидов. Таким образом, у данного пациента прогноз восстановления сперматогенеза – отрицательный. Пациенту рекомендовано ВРТ / ИКСИ (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида) с использованием донорской спермы.

Пример 2.

Пациент К-ов., 28 лет. Мужское бесплодие 5 лет. По данным спермограммы и клинического обследования – идиопатическая обструктивная азооспермия. Оценка сперматогенеза – 6 баллов. Количество триптаза-позитивных тучных клеток – 23 мм² в интерстиции яичка. Морфологически зрелые сперматозоиды при биопсии яичка не были получены. Согласно заявляемому изобретению, при показателе количества триптаза-позитивных тучных клеток 23 и более в 1 мм² в интерстиции яичка, на фоне нарушения сперматогенеза 6 баллов и ниже определяют необходимость выполнения протокола вспомогательных репродуктивных технологий с донацией сперматозоидов. Таким образом, у данного пациента прогноз восстановления сперматогенеза – отрицательный. Пациенту рекомендовано ВРТ/ИКСИ (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида) с использованием донорской спермы.

Пример 3.

Пациент Т-ов., 29 лет. Мужское бесплодие 6 лет. По данным спермограммы и клинического обследования – идиопатическая обструктивная азооспермия. Оценка сперматогенеза – 7–8 баллов. Количество триптаза-позитивных тучных клеток – 16 мм² в интерстиции яичка. Согласно заявляемому изобретению, показатель количества триптаза-позитивных тучных клеток не превышает 23 в 1 мм² в интерстиции яичка, на фоне нарушения сперматогенеза выше 6 баллов, что определяет возможность выполнения протокола вспомогательных репродуктивных технологий без донации сперматозоидов. При биопсии яичка были получены единичные морфологически зрелые сперматозоиды, поэтому у этого мужчины была взята ткань яичка для криоконсервации для последующего выполнения ИКСИ после плановой подготовки партнерши к трансферу эмбриона.

С целью разработки референсных значений для количества ТК в интерстиции яичка нами был проведен ROC-анализ клинической базы пациентов (n=18), обратившихся в клинику по лечению бесплодия, в ходе которого была определена точка разделения (cut-off) для количества тучных клеток в 1 мм² интерстиция яичка у мужчин с обструктивной азооспермией и с сохраненным сперматогенезом.

При статистической обработке полученных данных (ROC-анализ) была определена площадь под ROC - кривой, которая соответствует взаимосвязи прогноза обструктивной азооспермии и количества триптаза-позитивных тучных клеток в 1мм² интерстиция яичка у мужчин и составила 0,748±0,04 с 95% ДИ: 0,518-0,978.

Пороговое значение количества триптаза-позитивных тучных клеток в точке cut-off

составило 23,0 / мм². При выявлении количества тучных клеток в интерстиции яичка в равном или превышающем данное значение прогнозировалась тяжелая степень бесплодия (обструктивной азооспермии) с низкой эффективностью ЭКО/ИКСИ с применением собственных сперматозоидов и высокий прогноз необходимости ИКСИ с использованием донорской спермы. Чувствительность и специфичность метода составила 93,3% и 55,6% соответственно.

Наше исследование показало, что, что ТК яичка бесплодных мужчин содержат триптазу, содержание которой зависит от условий тканевого микроокружения яичка. Обнаружение большого количества ТК с крупными секреторными гранулами, содержащих триптазу, свидетельствует об активных процессах секреции протеазы в межклеточное вещество интерстиция яичка, что усиливает фибриллогенез и способствует развитию обструктивной азооспермии. Мы установили, что, массивная инфильтрация триптаза-позитивными тучными клетками интерстиция яичка, особенно вокруг извитых семенных канальцев (в зоне гемато-тестикулярного барьера) свидетельствует о тесной вовлеченности данного вида протеазы ТК в регуляцию сперматогенеза.

Одним из важных аспектов наших исследований, посвященных изучению причин нарушения сперматогенеза при обструктивной азооспермии, стало обнаружение и подсчет триптаза-позитивных ТК с помощью иммуногистохимического анализа. Таким образом, увеличение количества тучных клеток в интерстиции яичка может служить ориентиром в стратегии лечения бесплодных мужчин. Это позволило интерпретировать значимость изменения клеточного состава интерстиция яичка на степень нарушения сперматогенеза в конкретных цифровых значениях, что повышает точность диагностики обструктивной азооспермии и перспективность сохранности сперматогенеза для ВРТ.

Заявленный способ позволяет повысить точность и достоверность прогнозирования успешности программ ВРТ при обструктивной азооспермии, тем самым принять своевременные меры к осуществлению повторного протокола вспомогательных репродуктивных технологий с использованием аутоспермиев или донацией половых клеток. Тем самым сокращается количество безрезультатных попыток ВРТ и снижается субъективность морфологической оценки сперматогенеза.

Способ апробирован на достаточно большом материале и может быть рекомендован к использованию в центрах планирования семьи и репродукции.

(57) Формула изобретения

Способ определения необходимости выполнения вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) с донацией сперматозоидов при обструктивном мужском бесплодии, включающий анализ биоптата яичка, отличающийся тем, что у мужчин с обструктивной азооспермией получают биопсийный материал яичка, в котором на гистологическом срезе поперечных сечений извитых семенных канальцев исследуют методом световой микроскопии состояние сперматогенеза по десятибалльной шкале, далее исследуют интерстиций яичка и наличие в нем триптаза-позитивных тучных клеток в 1 мм², которые контрастируют с помощью иммуногистохимического окрашивания; при показателе количества триптаза-позитивных тучных клеток 23 и более в 1 мм² в интерстиции яичка на фоне нарушения сперматогенеза 6 баллов и ниже определяют необходимость выполнения протокола вспомогательных репродуктивных технологий с донацией сперматозоидов.