

Азооспермийн үед төмсөгний сперматогенезыг үнэлж, эр бэлгийн эс авах мэс ажилбарын үр дүнтэй харьцуулан судалсан дүн

П.Мягмарсүрэн^{1,3}, Ч.Наранцог², Л.Саямаа², Д.Жавхлантөгс¹, Э.Баярмаа², Д.Баян-Өндөр¹, М.Мөнхзол³, Э.Одхүү³

¹УНТЭ Урологи-Андрологийн төв

²АШУУИС БиоАС, Эмгэг судлал, Шүүх эмнэлгийн тэнхим

³АШУУИС БиоАС, Эмгэг физиологийн тэнхим

Цахим шуудан: p.myagmarsuren@fchm.edu.mn, Умач: 99195225

Түлхүүр үг:

Azoospermia Sperm retrieval Johnson's score TEX101 M-TESE

Товч утга

Үндэслэл: Азоосперми нь хамгийн хүнд хэлбэрийн эрэгтэй шалтгаант үргүйдэл бөгөөд нийт эрэгтэйчүүдийн 1%, үргүйдэлтэй эрчүүдийн 10-15%-г эзэлж байна. Азооспермийн үед төмсөг болон түүний дайвраас мэс заслын аргаар эр бэлгийн эс авч үр шилжүүлэн суулгах эмчилгээнд ашигладаг. Мэс заслаар бэлгийн эс гарахгүй тохиолдолд төмсөгний эдэд иммуногистохимийн арга ашиглан сперматогенезыг үнэлэж цаашдын эмчилгээний төлөвлөгөөг боловсруулах шинэ чиг хандлага анагаахын салбарт нэвтэрч байна.

Зорилго: Азооспермийн үеийн төмсөгний сперматогенезыг иммуногистохимийн арга ашиглан үнэлж, эр бэлгийн эс авах ажилбарын эмнэлзүйн үр дүнтэй харьцуулан судлах

Арга, аргачлал: 2019-2023 оны хооронд RMC үр шилжүүлэн суулгах үндэсний төвд азоосперми оношоор төмсөгнөөс эр бэлгийн эс гарган авах мэс ажилбарт орсон 71 эрэгтэйчүүдийг судалгаанд хамрууллаа. Төмсөгнөөс авагдсан эдийг бэхжүүлэн эд судлалын лабораторид дамжуулан Жонсоны оноогоор дүгнэж, төмсөгний сувганцар дахь эр бэлгийн эсийг иммуногистохимийн болон иммунофлуоресценцийн аргаар тодорхойлж сперматогенезыг үнэлэв.

Үр дүн: Жонсоны шалгуурыг муу, дунд болон сайн хэмээн 3 бүлэгт хувааж үнэлэн мэс ажилбарын эмнэлзүйн үр дүнг харьцуулан судллаа. Сперматогенез сайн, дунд болон муу бүлгүүдэд Жонсоны оноо, ийлдэс дэх өнчин тархины даавруудын дундаж статистик ач холбогдол бүхий ялгаатай байв ($p < 0.005$). Жонсоны үнэлгээ сайн бүлэгт TEX101 болон LDHC уургууд тод илрэлтэй, дунд бүлэгт сул илрэлтэй байв. Жонсоны үнэлгээ муу бүлэгт TEX101 болон LDHC уургууд илэрсэнгүй. Эр бэлгийн эс авах мэс ажилбарын үр дүнг бүлгүүдэд тооцоход сайн бүлэгт ($n=17/17$) 100%, дунд бүлэгт ($n=26/27$) 96.29%, муу бүлэгт ($n=8/27$) 29.62% байлаа.

Дүгнэлт: Азооспермитэй өвчтөнүүдийн төмсөг дэх сперматогенезыг эд судлалын аргаар үнэлэх нь мэс заслын эмчилгээний үр дүнг урьдчилан тооцоолох боломжтой байгаа нь нотлогдлоо.

Үндэслэл: ДЭМБ-ын тодорхойлсноор азоосперми гэдэг нь давтан шинжилгээгээр үрийн шингэнд эр бэлгийн эс байхгүй байхыг хэлэх бөгөөд эрэгтэй шалтгаант үргүйдэлд хүргэдэг эмгэг юм¹. Судлаач Jarow JP (1989 он) нар дэлхийн нийт эрэгтэйчүүдийн 1 хувь нь азоосперми оноштой бол үргүйдэлтэй эрэгтэйчүүдийн 10-15 хувь нь азоосперми эзлэдэг хэмээн тооцоолжээ². Харин Европийн Урологийн нийгэмлэгийн 2012 оны удирдамжид дурдсанаар эрэгтэй шалтгаант үргүйдлийн 11.2%-г азооспермийн хэлбэрийн үргүйдэл эзлэж байна³. Манай орны хувьд судлаач

Г.Баясгалан нарын судалгаагаар (2005 он) нийт 430 эрэгтэйчүүдэд үрийн шинжилгээ хийгдсэнээс 20.5% ($n=88$) нь азоосперми оношлогджээ⁴.

Азооспермийн үед төмсөг болон түүний дайвраас мэс заслын аргаар эр бэлгийн эс авах (sperm retrieval) хэд хэдэн төрлийн ажилбар хийгддэг⁵. Гарган авсан эр бэлгийн эсийг микроскопийн хяналтан дор micromanipulator ашиглан өндгөн эсэд тарьж (Intracellular sperm injection-ICSI) үр хөврөл үүсгэн, үр шилжүүлэн суулгах эмчилгээний аргаар жирэмсэн болох боломжтой.

Төмсөгний эд судлалын аргаар сперматогенезыг үнэлэх нь төмсөгнөөс эр бэлгийн эс авах мэс ажилбарын үр дүнг урьдчилан тооцоолох боломжтой хэмээн судлаачид үзэж байна⁶. Мэс заслын аргаар эр бэлгийн эс гарахгүй тохиолдолд төмсөгний эдэд иммуногистохимийн арга ашиглан сперматогенезыг үнэлэж цаашдын эмчилгээний төлөвлөгөөг боловсруулах шинэ чиг хандлага анагаахын салбарт нэвтэрч байна.

Зорилго: Азооспермийн үед төмсөгний сперматогенезыг иммуногистохимийн аргаар үнэлж, эр бэлгийн эс авах ажилбарын эмнэлзүйн үр дүнтэй харьцуулан судлах.

Арга, аргачлал: Бид энэхүү судалгааг аналитик судалгааны агшингийн загвараар гүйцэтгэж, 2019-2023 онуудад “RMC” үр шилжүүлэн суулгах үндэсний төвд азоосперми оношоор төмсөгнөөс эр бэлгийн эс гарган авах мэс ажилбарт орсон 71 эрэгтэйчүүдийг судалгаанд хамрууллаа. Судалгаанд хамрагдагсдад төмсөгний үзлэг хийж, хэмжээг тодорхойлон ийлдсийн FSH, LH болон тестостерон дааврын агууламжийг фермент холбох урвалын аргачлалаар Япон улсын Hitachi TOSOH AIA-360 иммуно-анализатораар стандарт цомог (AIA-PACK FSH, AIA-PACK LH, AIA-PACK Testosterone) ашиглан тодорхойлж протоколын дагуу гүйцэтгэж үр дүнг тооцлоо.

Мэс ажилбарын үед төмсөгнөөс эд авч 4% параформальдегидад бэхжүүлэн эд судлалын лабораторит Жонсоны оноог эд судлалын аргаар, төмсөгний сувганцарт иммуногистохимийн болон иммунофлуоресценцийн аргаар TEX101, SOX9, LDHC тодорхойлж сперматогенезыг үнэлэв. Жонсоны шалгуураар 1-4 оноо бол муу, 5-7 оноо бол дунд, 8-10 оноо бол сайн хэмээн 3 бүлэгт хувааж мэс ажилбарын эмнэлзүйн үр дүнг харьцуулан судлав.

Төмсөгнөөс эр бэлгийн эс авсан ажилбар:

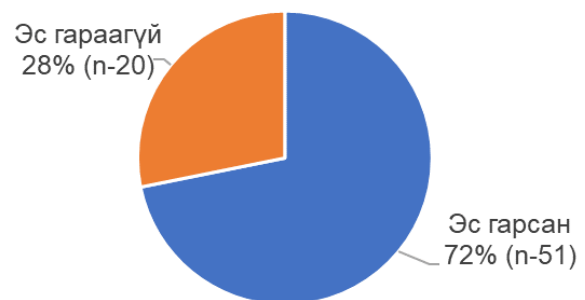
1. Төмсөгний дайвраас нарийн зүүний хатгалтаар эр бэлгийн эс соруулж авах (PESA): Хэсгийн мэдээ алдуулалт дор 21g эрвээхэй зүүг ашиглан төмсөгний дайврын толгойд хатгалт хийж дайврын шингэнийг соруулж авсан. Соруулсан дээжийг хуруу шилэнд хийж IVF лабораторит шилжүүлэв.

2. Бичил мэс заслаар төмсөгнөөс эр бэлгийн эс авах мэс ажилбар Microdissection TESE: Нугасны мэдээ алдуулалт дор төмсөгний хуйхнагын голын шугамаар зүслэг хийж үечлэн нээв. Төмсөгний tunica albuginea хальсанд босоо зүслэг (equatorial incision) төмсөгийг нээсэн. Мэс заслын микроскопи (өсгөлт x25) ашиглан үрийн өргөн сувганцруудыг (seminiferous tubules) ялган авч Петрийн таваг (Petri dish)-нд 0.4%-ийн сийвэнгийн альбуминтай 3 мл (HEPES buffered Earle's medium supplemented) уусмалд хийв. Дээжийг IVF лабораторит шилжүүлэв. Цус тогтоолтыг биполяр түлэгч ашиглан хийх бөгөөд

Викрил 4-0 утсаар шархыг үечлэн хааж ариун боолт хийв.

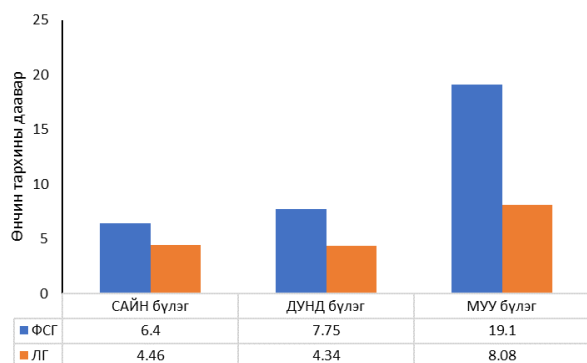
Төмсөгний бүтцийн өөрчлөлтийг эд судлалын аргаар үнэлэх: PESA, MESA, TESE болон micro-TESE ажилбарын үед төмсөгнөөс эд авч 4% параформальдегидийн уусмалд бэхжүүлэн эд судлалын лабораторид Жонсоны оноо болон TEX101 уургийг иммунохистомийн аргаар тодорхойлж төмсөгний бүтцийн өөрчлөлтийг үнэлсэн. Бэхжүүлсэн эдийн дээжийг урсгал усаар угааж 60-96%-ийн спирт болон ксилолын уусмалд өгсөх концентрациар дамжуулж эдийг усгүйжүүлэв. Усгүйжүүлсэн эдийг лааны тосонд цутгаж, хөлдөөх давцанд байршуулсан. Бэлтгэгдсэн эдийг микротом ашиглан 3-4 мкм зузаантай зүсэж, хематоксилин еозины будгаар будаж бэлтгэв. Төмсөгний сперматогенезийн хөгжлийг үрийн сувганцруудын эсийн тоо, бие гүйцэлтийн зэргээс хамаарч 1-10 оноо бүхий Жонсоны шалгуураар үнэлж, 1-4 оноо бол муу, 5-7 оноо бол дунд, 8-10 оноо бол сайн хэмээн 3 ангилав. TEX101 Иммунохистохимийн арга: Өмнө нь бэлтгэгдсэн парафин блокийг ашиглан TEX101, SOX9, LDHC анхдагч эсрэг биеэр 1 цаг будаж, HRP polymer, DAB plus chromogen ашигласан.

Үр дүн: Судалгаанд хамрагдагсдын дундаж нас 34.69 ± 5.02 жил байв. Мэс ажилбарын үр дүнг тооцоход PESA ажилбараар эс соруулагдсан ($n=36$, 50.7%), mTESE ажилбараар эс гарсан 20.8% ($n=16$) огт эс гараагүй 28.1% ($n=20$) байлаа. (Зураг 1)



Зураг 1. Эр бэлгийн эс авсан мэс заслын үр дүн

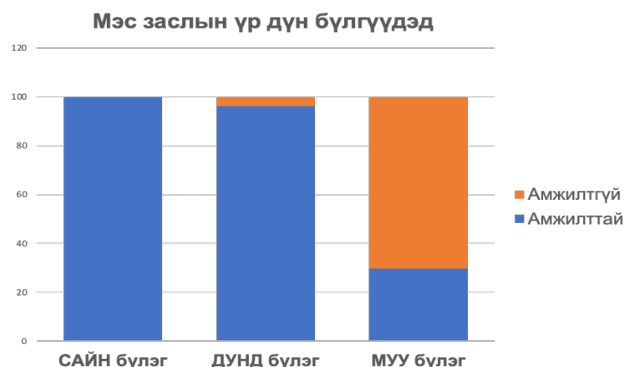
Жонсоны оноо муу бүлэгт ийлдэс дэх өнчин тархины дааврууд болох ФСГ болон ЛГ хэмжээ өндөр байв. (Зураг 2)



Зураг 2. Ийлдэс дэх өнчин тархины дааврын хэмжээг тодорхойлсон дүн

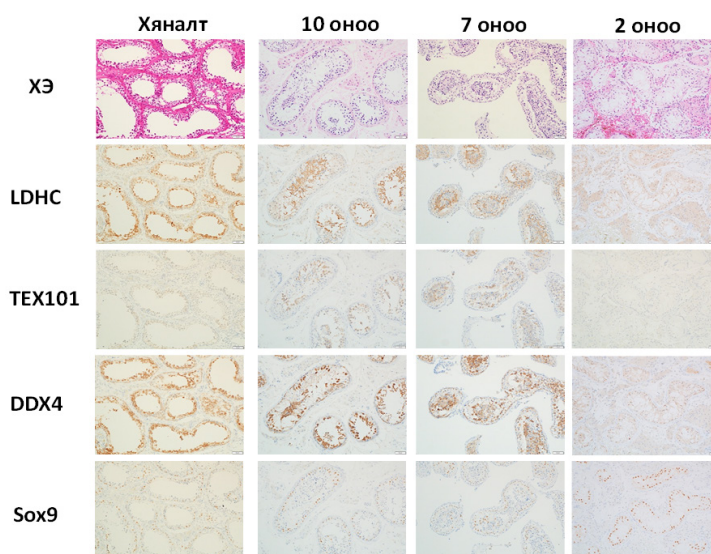
Орхидометр ашиглан төмсөгний хэмжээг тооцоход Жонсоны оноо сайн бүлэгт 20.94 ± 3.13 , дунд бүлэгт 19.25 ± 3.03 , муу бүлэгт 12.84 ± 3.84 байна. Жонсоны оноо муу байх тутам төмсөгний эзэлхүүний хэмжээ бага байгаа нь тодорхойлогдлоо.

Мэс ажилбар хийж эр бэлгийн эс ялган авсан байдлыг судалж үзэхэд сперматогенез сайн бүлэгт нийт ажилбарт орсон хүмүүсийн ($n=17/17$) 100% эр бэлгийн эс гарсан бол дунд бүлэгт ($n=26/27$) 96.29%, муу бүлэгт ($n=8/27$) 29.62% эр бэлгийн эс амжилттай авагдсан байна. (Зураг 3)



Зураг 3. Эр бэлгийн эсийг гарган авсан дүн

Жонсоны үнэлгээ сайн бүлэгт TEX101 болон LDHC уургууд тод илрэлтэй, дунд бүлэгт сул илрэлтэй байв. Харин Жонсоны үнэлгээ муу бүлэгт бэлгийн эсийн цитоплазмд TEX101 болон LDHC уургууд илэрсэнгүй. Дээрх үр дүнг бэлгийн эсийн маркер (DDX2) болон эсийн пролиферацийн маркер (Ki-67)-тай уялдуулан судлахад Жонсоны үнэлгээтэй шууд хүчтэй хамааралтай байлаа. (Зураг 4)



Зураг 4. Эд судлалын шинжилгээгээр бэлгийн эсийн маркер (DDX4), LDHC, TEX101 болон үүдэл эсийн маркер (Sox9) уургуудыг иммуногистохимийн аргаар төмсөгний эдэд илрүүлэв. Эдийн бичил бүтцийг хематоксилин эозин (ХЭ) будагдсан үнэлсэн.

Хэлцэмж: 2023 онд Ramasamy нарын 244 азосперми оноотой эрэгтэйчүүдэд хийгдсэн Жонсоны үнэлгээ болон эр бэлгийн эс гарган авах мэс заслын үр дүн хоорондын хамаарлыг судалсан судалгаанд Жонсоны оноо ≥ 9 байх үед спермийн илрэх магадлал 70% харин оноо < 5 үед сперм илрэх магадлал 0–10% байв. Жонсоны үнэлгээ багасах тусам эр бэлгийн авах мэс заслын

амжилт буурч байгаа нь бидний судалгаанд мөн ажиглагдсан⁶.

Ж.Микуз нарын судалгаагаар олигосперми эсвэл азооспермитэй 84 эрэгтэй хүний төмсөгний эдийн биопсийг шинжилсэн байна. Судалгааны үр дүнд ЛГ болон ФСГ дааврын түвшин өндөр байх нь эр бэлгийн эсүүдийн алдагдал, сувгийн нарийсалт болон завсрын эдийн фиброзтой

хүчтэй хамааралтай болох нь тогтоогджээ. Энэ нь дааврын өндөр түвшин нь Жонсоны оноо багасахтай шууд холбоотой бөгөөд сперматогенез муу байгааг илтгэсэн байдаг. Тэгвэл манай судалгаанд Жонсоны оноо муу бүлэгт ийлдэс дэх өнчин тархины дааврууд болох ФСГ болон ЛГ хэмжээ өндөр байгааг нь ижил үр дүнтэй байна.

TEX101 уураг нь азооспермийн үед төмсөг болон дайвараас эр бэлгийн эс авах мэс ажилбарын үр дүнг урьдчилан таамаглах боломжтой хамгийн ирээдүйтэй биомаркерын нэг хэмээн сүүлийн судалгаанд тодорхойлсон¹. TEX101 нь зөвхөн эр бэлгийн эсийн боловсролтод оролцдог гликопротеин бөгөөд түүний эсийн байршлыг тодорхойлох иммуногистохимийн аргад ашиглаж байна. Судалгаанаас үзвэл төмсөгний эдийг эсрэгбиетээр будаж тодорхойлсон бөгөөд сертоил ба Лейдигийн эсүүдээс ялгаатай нь TEX101 уураг нь зөвхөн meiosis-д орсон эсүүдэд тод илэрсэн. Тухайлбал, анхдагч сперматоцитийн цитоплазм, хоёрдогч сперматоцитийн мембран, мөн сперматид ба спермазоид зэрэг боловсорч гүйцсэн эсүүдэд эерэг будалттай байсан бол сперматогониа, сертоил эсүүд нь сөрөг будалт илэрсэн байв. Энэхүү ялгаварт будалт нь TEX101

нь зөвхөн үр тогтоох чадамжтай эр бэлгийн эсүүдэд илэрдэг онцлогтойг баталжээ⁸. Бидний судалгаагаар Жонсоны оноо сайн бүлэгт TEX101 уургийн нийлэгжил хүчтэй эерэг тодорхойлогдож байсан нь дээрхи судалгааны үр дүнтэй дүйж байна. LDHC (лактат дегидрогеназын С изофермент) уураг нь үр тогтоох чадамжтай эр бэлгийн эсүүдэд (spermatocytes, spermatids, spermatozoa) илэрдэг бөгөөд эр бэлгийн эсийн боловсролтын байдалтай шууд хамааралтай болохыг тогтоосон⁹. Энэхүү судалгааны үр дүнтэй харьцуулахад бидний судалгааны ажил дүйж байгаа бөгөөд сперматогенез сайн явагдаж байгаа төмсөгний эдэд LDHC уургийн нийлэгжил хүчтэй эерэг илэрсэн юм.

Дүгнэлт

1. Бидний судалгаанд азооспермитэй эрэгтэйчүүдийн Жонсоны оноо сайн болон дунд үнэлгээтэй бүлгээс мэс заслаар авагдсан эр бэлгийн эсийн илрэл сайн байв.

2. Жонсоны оноо их байх тусам төмсөгний сувганцарт TEX101, LDHC болон DDX4 уургийн илрэл хүчтэй эерэг илэрч байгаа нь мэс заслын эмчилгээний үр дүнг урьдчилан тооцоолох боломжтой байна.

Ном зүй:

1. WHO. Geneva: WHO Press; 2010. *World Health Organization: WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen* - 5th ed.
2. Jarow JP, Espeland MA, Lipshultz LI. Evaluation of the azoospermic patient. *J Urol*. 1989;142:62–5.
3. Jungwirth A, Diemer T, Dohle GR, Giwercman A, Kopa Z, Krausz C, Tournaye H. Guidelines on male infertility. EAU Guidelines 2012 edition. Uroweb 2012. Available from: http://www.uroweb.org/gls/pdf/15_Male_Infertility_LR%20II.pdf.
4. Bayasgalan, G., Naranbat, D., Amargajargal, O., Radnaabazar, J., Lhagvasuren, V., & Rowe, P. J. (2005). Risk factors of male infertility in Mongolian men. *Mongolian Journal of Health Sciences*, 2(1), 37–43. Mikuz, G. (1985).
5. Schlegel, P. N., Sigman, M., Collura, B., De Jonge, C. J., Eisenberg, M. L., Lamb, D. J., ... & Sandlow, J. I. (2021). Diagnosis and treatment of infertility in men: AUA/ASRM guideline part II. *The Journal of Urology*, 205(1), 22–29. <https://doi.org/10.1097/JU.0000000000001442>
6. Ramasamy, R., Kohn, T. P., Makeila, J. A., Li, P. S., & Schlegel, P. N. (2023). Association of testicular histopathology (Johnsen score) with sperm retrieval outcomes in men with nonobstructive azoospermia. *Fertility and Sterility*, 120(5), 1010–1019. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2023.09.001>
7. Correlation of hormone levels and quantitative histological findings in testicular biopsies. *Neuroendocrinology*, 11(2), 110–116.
8. Zhang, Y., Wang, Z., Liu, Y., Liu, J., Xu, C., & Zhang, Y. (2014). Human testis-expressed sequence 101 is limitedly distributed in germinal epithelium of testis and disappears in seminoma. *Biological Research*, 47, Article 52.
9. Wang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Zhang, X., Xu, Y., Zhang, Y., & Chen, C. (2013). Expression of lactate dehydrogenase C in human testis and its potential role in spermatogenesis. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11(1), 31. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-31>
10. John Johnsen SG. Testicular biopsy score count- a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1970;1:2-25.
11. Shen, C. C., Kang, Y. H., Yu, L., et al. (2014). Human testis-expressed sequence 101 is limitedly distributed in germinal epithelium of testis and disappears in seminoma. *Biological Research*, 47, 52.
12. Drabovich, A. P., Jarvi, K., & Diamandis, E. P. (2013). Differential diagnosis of azoospermia with proteomic biomarkers ECM1 and TEX101 quantified in seminal plasma. *Science Translational Medicine*, 5(212), 212ra160.
13. Jarvi, K., et al. (2021). Semen biomarker TEX101 predicts sperm retrieval success for men with testicular failure. *F1000Research*, 10, 569.
14. Nicopoulos, J. D., Gilling-Smith, C., Almeida, P. A., Norman-Taylor, J., Grace, I., & Ramsay, J. W. (2004). Use of surgical sperm retrieval in azoospermic men: a meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 82(3), 691–701.
15. Esteves, S. C., Miyaoka, R., Orosz, J. E., & Agarwal, A. (2013). An update on sperm retrieval techniques for azoospermic males. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 68 Suppl 1(Suppl 1), 99–110. [doi:10.6061/clinics/2013-Sup0111](https://doi.org/10.6061/clinics/2013-Sup0111)

Impact of Spermatogenic Activity on the Outcome of Sperm Retrieval Procedures in Azoospermic Patient

Myagmarsuren P^{1,3}, Narantsog Ch², Sayamaa L², Javkhlantugs D¹, Bayarmaa E², Bayan-Undur D¹, Munkhzol M³, Odkhuu E³

¹Center of Urology Andrology, FCHM

² Department of Pathology & Forensic Medicine, School of Biomedicine, MNUMS

³ Department of Pathophysiology, School of Biomedicine, MNUMS

E-mail: p.myagmarsuren@fchm.edu.mn, Tel: +976-99195225

Keywords:

Azoospermia, Sperm retrieval, Johnson's score, TEX101, M-TESE

Background: Azoospermia is the most severe form of male infertility, affecting approximately 1% of male population and 10–15% of infertile men. In azoospermia cases, sperm retrieval from the testis or epididymis through surgical procedures is used for assisted reproductive treatments. When no sperm is retrieved, recent approaches in medicine suggest using immunohistochemical methods to evaluate spermatogenesis in testicular tissue and plan further treatments.

Aim: To evaluate spermatogenesis in testicular tissue of azoospermic patients using immunohistochemistry and compare the findings with the clinical outcomes of sperm retrieval procedures.

Materials and Methods: This study included 71 azoospermic men who underwent micro-TESE procedures at the IVF center (RMC) between 2019 and 2023. The excised testicular tissues were fixed, processed histologically, and evaluated using Johnson's score. The presence of spermatozoa in seminiferous tubules was detected by immunohistochemical and immunofluorescence staining, using markers such as TEX101 and LDHC.

Results: Johnson's score was categorized into three groups: poor, moderate, and good spermatogenesis. These were statistically compared with hormonal levels and surgical sperm retrieval outcomes. There were significant differences in Johnson's scores and serum FSH and LH levels among the three groups ($p < 0.005$). TEX101 and LDHC proteins were strongly expressed in the good group, weakly in the moderate group, and absent in the poor group. The success rate of sperm retrieval was 100% (17/17) in the good group, 96.29% (26/27) in the moderate group, and only 29.62% (8/27) in the poor group.

Conclusion: Histological evaluation of spermatogenesis in azoospermic patients can help predict the outcome of surgical sperm retrieval, indicating its clinical value in treatment planning.