

## **Приложение 1. Дополнительные материалы и методы**

Всем участникам было дано указание воздержаться от семяизвержения в течение по меньшей мере 48 часов до визита в центр, но их все равно включали, даже если они воздерживались менее 48 часов. Время воздержания рассчитывали, отнимая от записанной даты и часа получения образца записанную дату и час предыдущей эякуляции. Мужчин включали в настоящее исследование, только если были доступны данные о наличии и степени левостороннего и правостороннего варикоцеле.

Каждый из участвующих мужчин отвечал на опросник, сдавал образец венозной крови, сдавал один образец семенной жидкости и проходил медицинский осмотр. Медицинские осмотры проводили несколько врачей, большинство из которых имело специальную подготовку для проведения обследования для исследования. Однако 6 датских врачей, обследовавших в общей сложности 841 мужчину, не имели специальной подготовки по выявлению варикоцеле перед обследованием популяции для исследования. Таким образом, мы исключили результаты от этих экспертов из исследования, что привело к конечному числу из 7035 мужчин, включенных в настоящее исследование.

Участники получали денежную компенсацию (20-65 евро).

### *Опросник*

Опросник был разработан на английском языке и переведен на датский, финский, эстонский, латвийский, литовский и немецкий языки; затем он был переведен обратно для контроля ошибок перевода [1–3]. Участники получали опросник перед посещением исследовательского подразделения, и им предлагали заполнить его заранее и, если возможно, совместно с матерями. Опросник включал информацию о предшествующих и текущих заболеваниях, любой известный анамнез о потенциале фертильности и факторы образа жизни [4]. В день участия мы просматривали заполненную анкету вместе с участником, чтобы рассмотреть любые вопросы или неточности и убедиться, что анкета была заполнена правильно и полностью.

### *Образцы семенной жидкости*

Образцы семенной жидкости были получены путем мастурбации и эякуляции в чистую пробирку для сбора образцов в уединенной комнате в научно-исследовательском отделении. Период воздержания рассчитывали из самосообщенного времени предыдущей и нынешней эякуляции. Образцы хранили при 37°C до анализа. Объем семенной жидкости определяли путем взвешивания, за исключением Литвы в первый период исследования

(1997-98), где объем измеряли в градуированной пробирке с точностью 0,1 мл. Для оценки подвижности сперматозоидов 10 мкл хорошо перемешанной семенной жидкости помещали на предметное стекло, которое хранили при 37°C, покрывали покровным стеклом 22×22 мм и исследовали при 400-кратном увеличении. Сперматозоиды классифицировали как подвижные (включающие как прогрессивно-, так и не прогрессивно-подвижные сперматозоиды) или неподвижные. Концентрацию сперматозоидов оценивали с использованием улучшенных гемоцитометров Нейбауэра, за исключением Копенгагена, где использовали гемоцитометры Бюркера-Тюрка (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Germany). Мазки высушивали на воздухе, фиксировали в 96% этаноле и посылали в одну из пяти андрологических лабораторий для морфологической оценки согласно строгим критериям [5]. Лаборатории участвовали в программе внешнего контроля качества для оценки концентрации сперматозоидов, и результаты использовали для коррекции по межлабораторным различиям, как описано ранее [1, 2, 4, 6–8].

#### *Образцы крови*

В день обследования брали образец крови из локтевой вены, центрифугировали, отделяли и замораживали сыворотку. Образцы посылали в отделение роста и репродукции (Ригсхоспиталитет, Копенгаген, Дания) для централизованного анализа. Определяли уровни в сыворотке фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ) и глобулин, связывающий половые гормоны (ГСПГ) с использованием иммунофлуоресцентного анализа с временным разрешением (Delfia, Wallac, Turku, Finland). Уровни тестостерона определяли с использованием иммунофлуоресцентного анализа с временным разрешением (Delfia, Wallac, Turku, Finland), а эстрадиола – путем радиоиммунологического анализа (Pantex, Santa Monica, USA). Все анализы гормонов производили партиями в конце периодов подысследования (1998 - 5,3% образцов, 2000 - 18,1%, 2001/2 - 10,3%, 2003 - 11,1%, 2005 - 31,8%, 2008/9 - 16,6% и 2010 - 6,8%). Коэффициенты вариаций для одного анализа и серии анализов (CV) для измерения ФСГ и ЛГ составили 3% и 4,5%, соответственно. CV для тестостерона и ГСПГ составили <8% и <5%, соответственно. Для эстрадиола CV для одного анализа и серии анализов были 7,5% и 13%. Для ингибина В CV для одного анализа и серии анализов составили 15% и 18%. Образцы анализировали на ингибин В до 2010 года с использованием материала набора от Oxford Bioinnovation в 2008 году и с 2010 года при помощи материала набора от DSL

Beckman, USA. В промежутке между 2008/9 и 2010 годами незначительная коррекция была сделана для анализа ингибина В, которая привела к более низкому уровню обнаружения (LOD (7 пг/мл)) в 2010, чем в 2008 (20 пг/мл). Свободный тестостерон (сFT) рассчитывали из тестостерона и ГСПГ с использованием значения фиксированного альбумина согласно Vermeulen *et al.* [9]. Также рассчитывали соотношения ингибина В к ФСГ, тестостерона к ЛГ и свободного тестостерона к ЛГ.

#### *Статистика*

Мужчин с двусторонним варикоцеле классифицировали согласно наиболее высокой степени их варикоцеле. У нас были данные по морфологически нормальным сперматозоидам только для 6366 мужчин и данные по общему количеству морфологически нормальных сперматозоидов для 6378 мужчин. Расхождение между этими цифрами в 12 человек вызвано наличием азооспермии у всех 12 мужчин, и таким образом, невозможностью произвести морфологическую оценку. Недостающие данные практически полностью были от эстонских мужчин из Тарту, Эстония, и мужчин из Каунаса, Литва.

Для базовой описательной статистики использовали средние, медианы, стандартные отклонения (SD). Все мужчины были разделены на 4 группы в соответствии с наличием и степенью варикоцеле. Для этих описательных межгрупповых различий по непрерывным переменным проводили тестирование по непараметрическому критерию Крускала-Уоллиса. Межгрупповые различия по качественным значениям тестировали с использованием критерия Пирсона  $\chi^2$  и точного критерия Фишера, когда не выполнялись допущения для критерия Пирсона.

Мужчин классифицировали на 3 группы по качеству семенной жидкости следующим образом: концентрацию сперматозоидов <15 млн/мл и/или подвижность <32% и/или нормальная морфология <4% обозначали как «низкое качество семенной жидкости». Мужчин с концентрацией сперматозоидов >40 млн/мл и подвижностью >50% и нормальной морфологией >9% обозначали как «высокое качество семенной жидкости». Мужчины с параметрами семенной жидкости выше, чем использованные для определения «низкого качества семенной жидкости», но не соответствующими «высокому качеству семенной жидкости», классифицировали как «промежуточное качество семенной жидкости». Межгрупповые различия для групп качества семенной жидкости тестировали при помощи непараметрического U-теста Манна-Уитни и критерия Крускала-Уоллиса.

Основные выходные переменные представляли собой отдельные показатели семенной жидкости и гормональные показатели. Ассоциацию варикоцеле и этих переменных тестировали путем анализа множественной логистической регрессии, скорректированного по искажающим факторам (см. ниже). Объем семенной жидкости, концентрация сперматозоидов, общее количество сперматозоидов и общее количество нормальных сперматозоидов были нормированы наилучшим образом путем преобразования кубического корня перед анализом, чтобы скорректировать ассиметричное распределение остатков, в то время как с целью обратного расчета изменений этих показателей семенной жидкости они были нормированы путем логарифмического преобразования. Процентные содержания прогрессивно-подвижных сперматозоидов были логит-трансформированы. Процентные содержания морфологически нормальных сперматозоидов были близки к нормальному распределению и были включены в модель без преобразования. Все результаты по гормонам были логарифмически преобразованы перед анализом для того, чтобы скорректировать ассиметричное распределение.

Для показателей семенной жидкости были выявлены возможные искажающие факторы и сгруппированы как безусловные ковариаты и потенциальные ковариаты. Были выбраны следующие безусловные ковариаты, поскольку их влияние на качество семенной жидкости было описано в литературе: возраст [10], курение (да/нет) [11–13], ИМТ [14], предшествующий диагноз крипторхизма [15, 16] и центр участия [2, 3]. Дополнительно, длительность воздержания от семяизвержения [17, 18] добавляли в модель в виде кусочно-линейных функций (линейные сплайны: одна прямая линия для воздержания менее 48 часов, другая прямая линия для периода воздержания 48-96 часов и еще одна для воздержания свыше 96 часов). Потенциальные ковариаты оценивали, вводя их пошагово и проверяя на статистическую значимость на уровне 0,05. Следующие переменные были признаны существенными искажающими факторами для одного или нескольких показателей семенной жидкости: предшествующий диагноз эпидидимита, предшествующий диагноз хламидиоза и/или гонореи, предшествующий диагноз паховой грыжи, прием препаратов в течение некоторого времени в пределах трех месяцев до обследования и предшествующая операция в связи с перекрутом яичка. Все эти факторы ввели как ковариаты в конечную модель регрессионного анализа для показателей семенной жидкости.

Для гормональных показателей были выбраны следующие безусловные ковариаты, поскольку их ассоциации с гормональными показателями были описаны в литературе: курение [11, 19, 20], время суток для забора крови [21–23] и ИМТ [19, 24]. Потенциальные ковариаты оценивали, вводя их пошагово и проверяя на статистическую значимость на уровне 0,05. Следующие переменные были признаны существенными искажающими факторами для одного или нескольких гормональных показателей: употребление алкоголя, предшествующий диагноз эпидидимита, прием препаратов в пределах трех месяцев до обследования и предшествующий диагноз крипторхизма. Все гормональные показатели значительно отличались между центрами участия. Все эти факторы ввели как ковариаты в конечную модель регрессионного анализа для гормональных показателей.

В регрессионном анализе было выявлено значимое взаимодействие между центром участия и общим количеством сперматозоидов. Это взаимодействие, однако, существенно не изменило результаты, но в субанализе (не представлен) кажется, что в центрах с более лучшей функцией яичек в целом мужчины с варикоцеле были менее серьезно поражены по сравнению с мужчинами в центрах с более плохой функцией яичек.

Как было описано, 848 мужчин были исключены из анализа, поскольку их медицинский осмотр проводили врачи, не подготовленные для диагностики варикоцеле. Проводили анализ подгруппы (не описан), включающей этих мужчин, в результате чего общее количество мужчин достигло 7883. Этот анализ подгруппы показал аналогичные тенденции как для гормональных показателей, так и для показателей семенной жидкости. Единственным изменением в уровнях значимости в пределах 0,05 за счет этого включения было то, что различие по соотношению ингибин В/ФСГ для 1-й степени больше не было статистически значимым по сравнению с отсутствием варикоцеле, в то время как различие в концентрации ЛГ при 3-й степени достигло статистической значимости по сравнению с отсутствием варикоцеле.

Значение  $p < 0,05$  считали статистически значимым. Все анализы проводили при помощи IBM SPSS версии 19 для Windows.

### **Дополнительные ссылки**

1. Punab M, Zilaitiene B, Jørgensen N, Horte A, Matulevicius V, Peetsalu A, et al. Regional differences in semen qualities in the Baltic region. *Int J Androl* 2002;25:243–52.

2. Jørgensen N, Carlsen E, Neramo I, Punab M, Suominen J, Andersen A-G, et al. East-West gradient in semen quality in the Nordic-Baltic area: a study of men from the general population in Denmark, Norway, Estonia and Finland. *Hum Reprod Oxf Engl* 2002;17:2199–208.
3. Jørgensen N, Andersen AG, Eustache F, Irvine DS, Suominen J, Petersen JH, et al. Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod Oxf Engl* 2001;16:1012–9.
4. Jørgensen N, Vierula M, Jacobsen R, Pukkala E, Perheentupa A, Virtanen HE, et al. Recent adverse trends in semen quality and testis cancer incidence among Finnish men. *Int J Androl* 2011;34:e37–48. doi:10.1111/j.1365-2605.2010.01133.x.
5. Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod Oxf Engl* 1990;5:586–92.
6. Jørgensen N, Joensen UN, Jensen TK, Jensen MB, Almstrup K, Olesen IA, et al. Human semen quality in the new millennium: a prospective cross-sectional population-based study of 4867 men. *BMJ Open* 2012;2. doi:10.1136/bmjopen-2012-000990.
7. Paasch U, Salzbrunn A, Glander HJ, Plambeck K, Salzbrunn H, Grunewald S, et al. Semen quality in sub-fertile range for a significant proportion of young men from the general German population: a co-ordinated, controlled study of 791 men from Hamburg and Leipzig. *Int J Androl* 2008;31:93–102. doi:10.1111/j.1365-2605.2007.00860.x.
8. Fernandez MF, Duran I, Olea N, Avivar C, Vierula M, Toppari J, et al. Semen quality and reproductive hormone levels in men from Southern Spain. *Int J Androl* 2012;35:1–10. doi:10.1111/j.1365-2605.2010.01131.x.
9. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3666–72. doi:10.1210/jcem.84.10.6079.

10. Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil Steril* 2001;75:237–48.
11. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Jensen MS, Toft G, Bonde JP. Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Hum Reprod* 2007;22:188–96. doi:10.1093/humrep/del364.
12. Künzle R, Mueller MD, Hänggi W, Birkhäuser MH, Drescher H, Bersinger NA. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil Steril* 2003;79:287–91. doi:10.1016/S0015-0282(02)04664-2.
13. Kumosani TA, Elshal MF, Al-Jonaid AA, Abduljabar HS. The influence of smoking on semen quality, seminal microelements and Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity among infertile and fertile men. *Clin Biochem* 2008;41:1199–203. doi:10.1016/j.clinbiochem.2008.07.013.
14. Eisenberg ML, Kim S, Chen Z, Sundaram R, Schisterman EF, Buck Louis GM. The relationship between male BMI and waist circumference on semen quality: data from the LIFE study. *Hum Reprod Oxf Engl* 2014;29:193–200. doi:10.1093/humrep/det428.
15. Hadziselimovic F. Cryptorchidism, Its Impact on Male Fertility. *Eur Urol* 2002;41:121–3. doi:10.1016/S0302-2838(01)00040-9.
16. Chung E, Brock GB. Cryptorchidism and its impact on male fertility: a state of art review of current literature. *Can Urol Assoc J* 2011;5:210–4. doi:10.5489/cuaj.10106.
17. Levitas E, Lunenfeld E, Weiss N, Friger M, Har-Vardi I, Koifman A, et al. Relationship between the duration of sexual abstinence and semen quality: analysis of 9,489 semen samples. *Fertil Steril* 2005;83:1680–6. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.12.045.
18. Carlsen E, Petersen JH, Andersson A-M, Skakkebaek NE. Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality. *Fertil Steril* 2004;82:358–66. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.01.039.

19. Field AE, Colditz GA, Willett WC, Longcope C, McKinlay JB. The relation of smoking, age, relative weight, and dietary intake to serum adrenal steroids, sex hormones, and sex hormone-binding globulin in middle-aged men. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1310–6. doi:10.1210/jcem.79.5.7962322.
20. Trummer H, Habermann H, Haas J, Pummer K. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Hum Reprod* 2002;17:1554–9. doi:10.1093/humrep/17.6.1554.
21. Brambilla DJ, Matsumoto AM, Araujo AB, McKinlay JB. The effect of diurnal variation on clinical measurement of serum testosterone and other sex hormone levels in men. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:907–13. doi:10.1210/jc.2008-1902.
22. Carlsen E, Olsson C, Petersen JH, Andersson AM, Skakkebaek NE. Diurnal rhythm in serum levels of inhibin B in normal men: relation to testicular steroids and gonadotropins. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1664–9. doi:10.1210/jcem.84.5.5708.
23. Jørgensen N, Liu F, Andersson A-M, Vierula M, Irvine DS, Auger J, et al. Serum inhibin-b in fertile men is strongly correlated with low but not high sperm counts: a coordinated study of 1,797 European and US men. *Fertil Steril* 2010;94:2128–34. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.12.051.
24. Ehala-Aleksejev K, Punab M. The different surrogate measures of adiposity in relation to semen quality and serum reproductive hormone levels among Estonian fertile men. *Andrology* 2015. doi:10.1111/andr.12002.