

Ο ρόλος του σπερμοδιαγράμματος στη
διερεύνηση της ανδρικής γονιμότητας:
Μία θεμελιώδης εξέταση,
αλλά με σοβαρούς περιορισμούς

Χαράλαμπος Κ. Μαμουλάκης

Επίκουρος Καθηγητής Ουρολογίας Παν. Κρήτης

Ουρολογική Κλινική

Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Ιατρικής



Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests

Semen analysis is the first step to identify male factor infertility. Standardized methods of semen analysis are available allowing accurate assessment of sperm quality and comparison among laboratories. Population-based reference ranges are available for standard semen and sperm parameters. Sperm numbers and morphology are associated with time to natural pregnancy, whereas sperm motility may be less predictive. Routine semen analysis does not measure the fertilizing potential of spermatozoa and the complex changes that occur in the female reproductive tract before fertilization. Whether assisted reproduction technology (ART) is required depends not only on male factors but female fecundity. Newer tests should predict the success of fertilization in vitro and the outcome of the progeny. (Fertil Steril® 2014;102:1502–7. ©2014 by American Society for Reproductive Medicine.)

Fertil Steril. 2014;102:1502–7

New generation of diagnostic tests for infertility: Review of specialized semen tests

Abstract: The initial evaluation of the subfertile male includes a thorough history and physical examination, semen analyses, and hormonal evaluation. However, a normal spermiogram does not necessarily correlate with fertility potential, because it does not assess sperm function. For this reason, specialized semen tests have been developed to test various aspects of spermatozoal function. This article reviews basic male reproductive physiology, as well as clinically utilized advanced seminal tests, including their methodology and implications for reproductive technology outcomes and fecundity.



- Μελέτη 430 ζευγαριών: επίτευξη πρώτης κύησης στο 65% αυτών με $>40 \times 10^6$ σπερματοζωάρια /mL έναντι 51% με χαμηλότερη συγκέντρωση

Lancet 1998;352:1172–7

- Μελέτη 765 υπογόνιμων ζευγαριών: σημαντική επικάλυψη ως προς την συγκέντρωση, κινητικότητα και μορφολογία των σπερματοζωαρίων μεταξύ των γόνιμων και υπογόνιμων ανδρών

N Engl J Med. 2001; 345: 1388–93

- Σε 20-30% υπογόνιμων ανδρών το σπερμοδιάγραμμα είναι «φυσιολογικό» (δεν εντοπίζει κάποια λειτουργική ανεπάρκεια υπεύθυνα για την υπογονιμότητα)

Int Braz J Urol. 2014;40:443–53



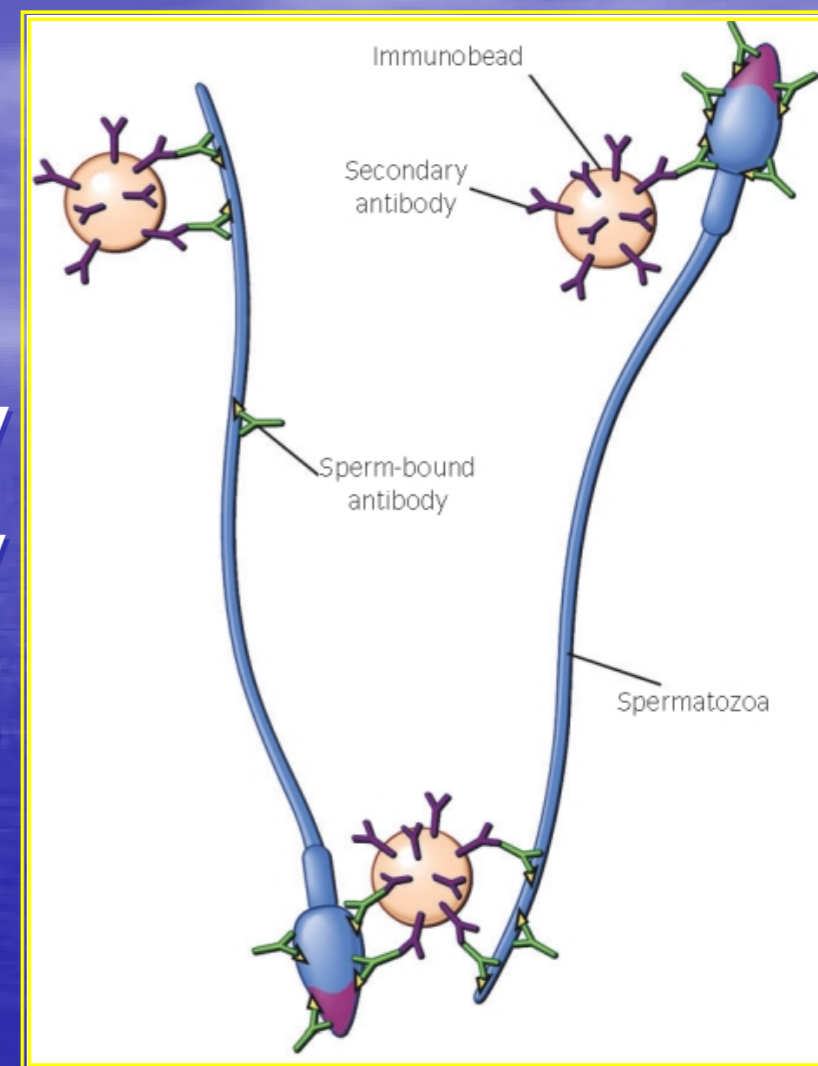
Εξειδικευμένες δοκιμασίες ελέγχου ειδικών λειτουργιών των σπερματοζωαρίων

- Παρουσία αντισπερματικών αντισωμάτων
- Υπο-οσμωτική διόγκωση (hypo-osmotic swelling test)
- Μέτρηση κινητικότητας με χρήση αυτόματου αναλυτή (Computer Assisted Sperm Analysis, CASA)
- Σύνδεση με τη διαφανή ζώνη (hemizona assay)
- Αντίδραση ακροσώματος (acrosin test)
- Δεισδυτικότητα σε ετερόλογο ωάριο (penetration assay or zona-free hamster oocyte test)
- Προσδιορισμός ROS στο σπερματικό υγρό
- Βλάβες DNA σπερματοζωαρίων

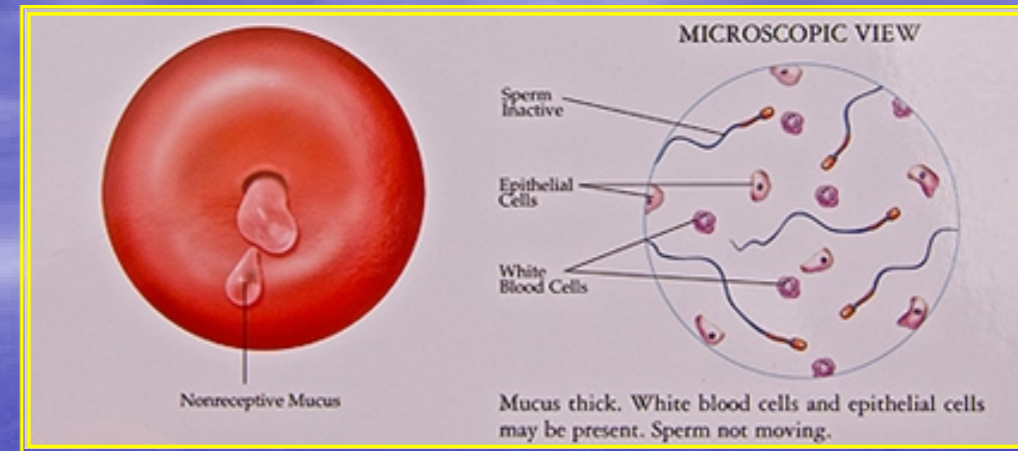
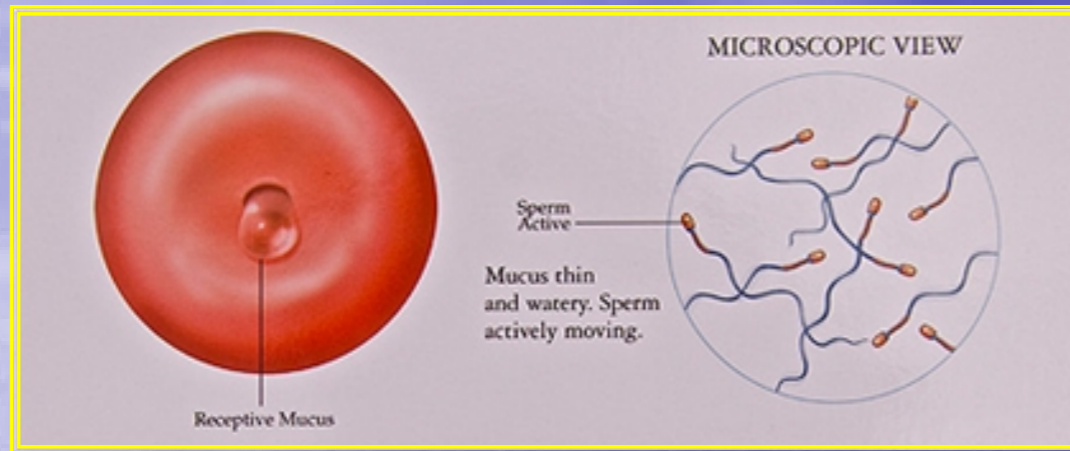


Αντισπερματικά αντισώματα (IgG και IgA)

- 4-8% υπογόνιμων ανδρών
- Παραβίαση αιματορχικού φραγμού:
 - Απόφραξη αποχετευτικής οδού
 - Απολίνωση-διατομή σπερμ. πόρων
 - Φλεγμονή επικ. γεννητικών αδένων
 - Κακώσεις όρχεων
 - Κρυπορχία
- Προκαλούν:
 - Συγκόλληση - Ακινητοποίηση
 - Καταστροφή σπερμ/ζωαρίων (νεκροσπερμία)
- IBT/MAR test (συγκόλληση >50% σπερματοζωαρίων)
- Επιβεβαίωση με τη δοκιμασία τραχηλικής βλέννης (κλινικά σημαντικό αποτέλεσμα)



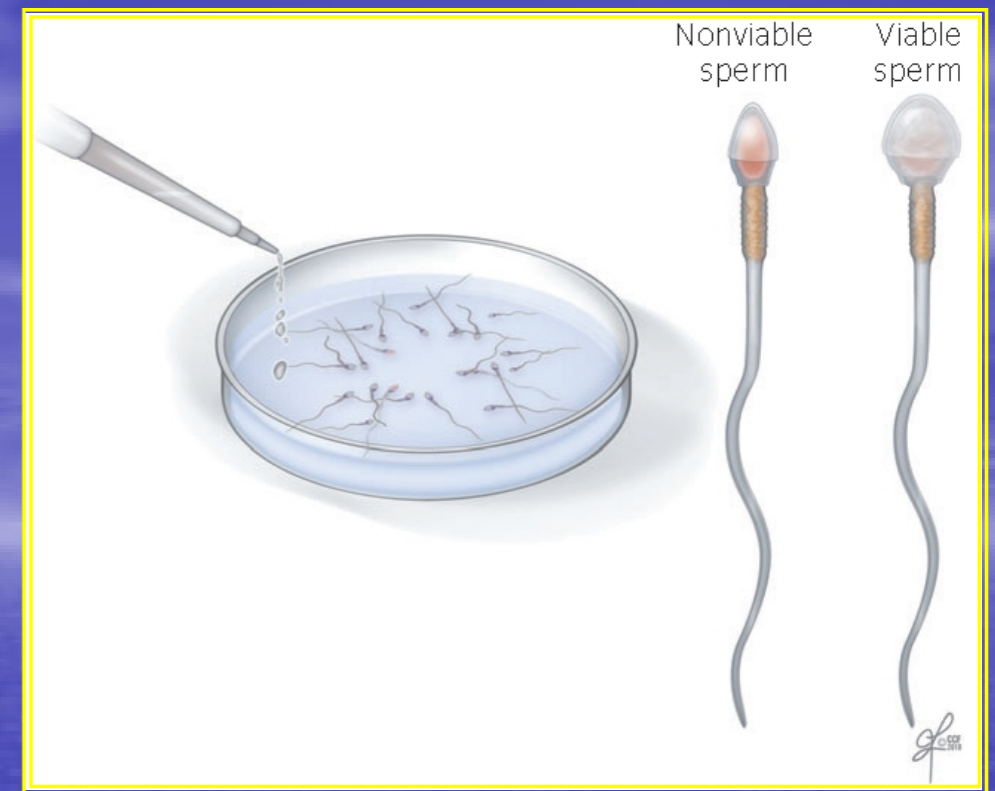
Δοκιμασία τραχηλικής βλέννας (postcoital test, Simms-Huhner test)



- ΤΒ: φραγμός προστασίας ♀ γεννητικού σωλήνα
- Είσοδος σπερματοζωαρίων επιτρέπεται μόνο κατά την προωθυλακιορρηκτική περίοδο (↑ οιστρογονική δραστηριότητα → αλλαγή φυσ/χημικών ιδιοτήτων ΤΒ
- Προστατεύει τα σπερματοζωάρια (όξινα κοιλτικά υγρά και φαγοκυττάρωση)
- Η δοκιμασία ελέγχει τις παράμετροι της ΤΒ κατά την ωορρηξία (όγκος, εκτασιμότητα), τη βιωσιμότητα-κινητικότητα σπερματοζωαρίων 9-24h μετά επαφή



Δοκιμασία υπο-οσμωτικής διόγκωσης (hypo-osmotic swelling test)



- Εκτιμά τη βιωσιμότητα των ακίνητων σπερμ/ζωαρίων
- Ένδειξη επί χαμηλής κινητικότητας (<5-10%)
- ΔΔ: νεκροσπερμία – ακινησία
- Τοποθέτηση σπερμ/ζωαρίων σε υπότονο μέσο
- Εάν το σπερμ/ζωάριο είναι ζωντανό, νερό εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα → εξίσωση ωσμωτικότητας → εξοίδηση ουράς
- Φυσιολογική δοκιμασία: >60% με διόγκωση



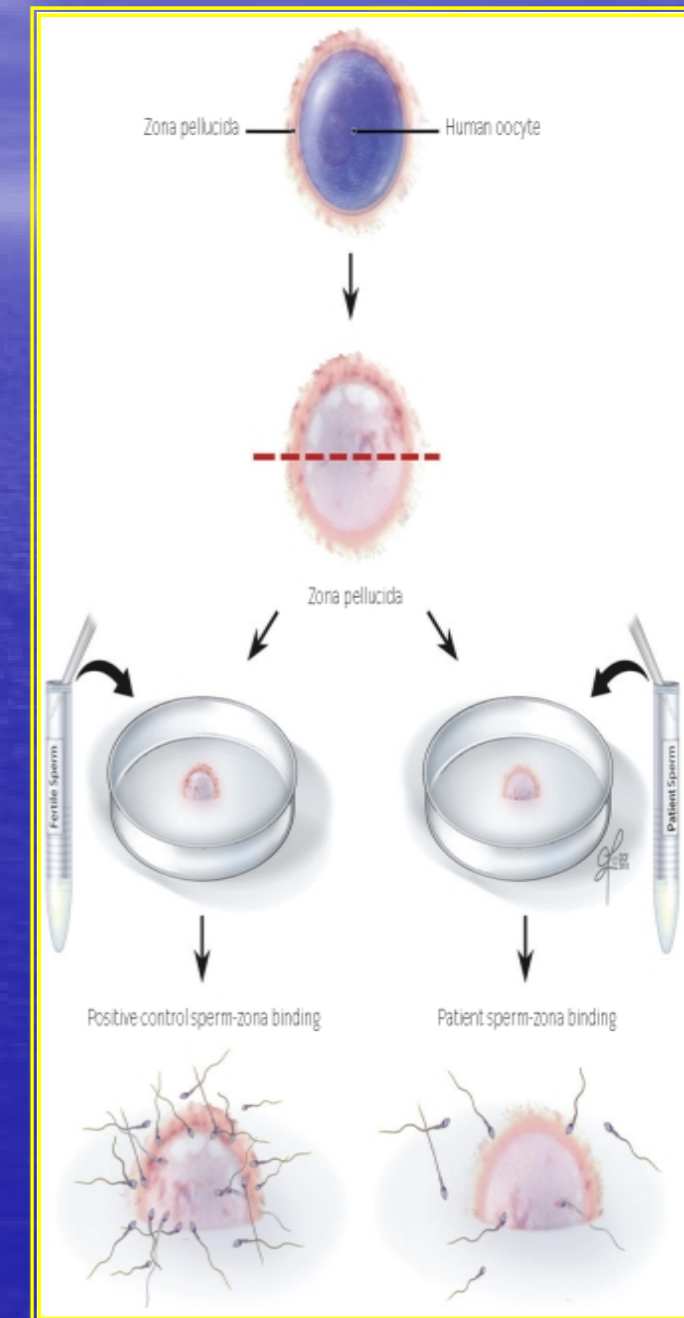
Αυτοματοποιημένη ανάλυση σπέρματος (Computer Assisted Sperm Analysis, CASA)

- Εκτιμά ποικιλία παραμέτρων:
 - Αριθμός
 - Συγκέντρωση
 - Μορφολογία
 - **Κινητικότητα και ιδιαίτερα χαρακτηριστικά κίνησης** (ταχύτητα–γραμμικότητα) μη αντιληπτά από το μάτι
- Πλεονεκτεί στην εκτίμηση της **υπερενεργοποίησης**
- Μειονεκτεί στην εκτίμηση του αριθμού (ο αναλυτής δεν ξεχωρίζει σπερματοζωάρια από κατεστραμμένα στοιχεία (debris) φυσιολογικά στο εκσπερμάτισμα)
- Ο ρόλος στην πρόγνωση της γονιμότητας παραμένει κατά κύριο λόγο ερευνητικός

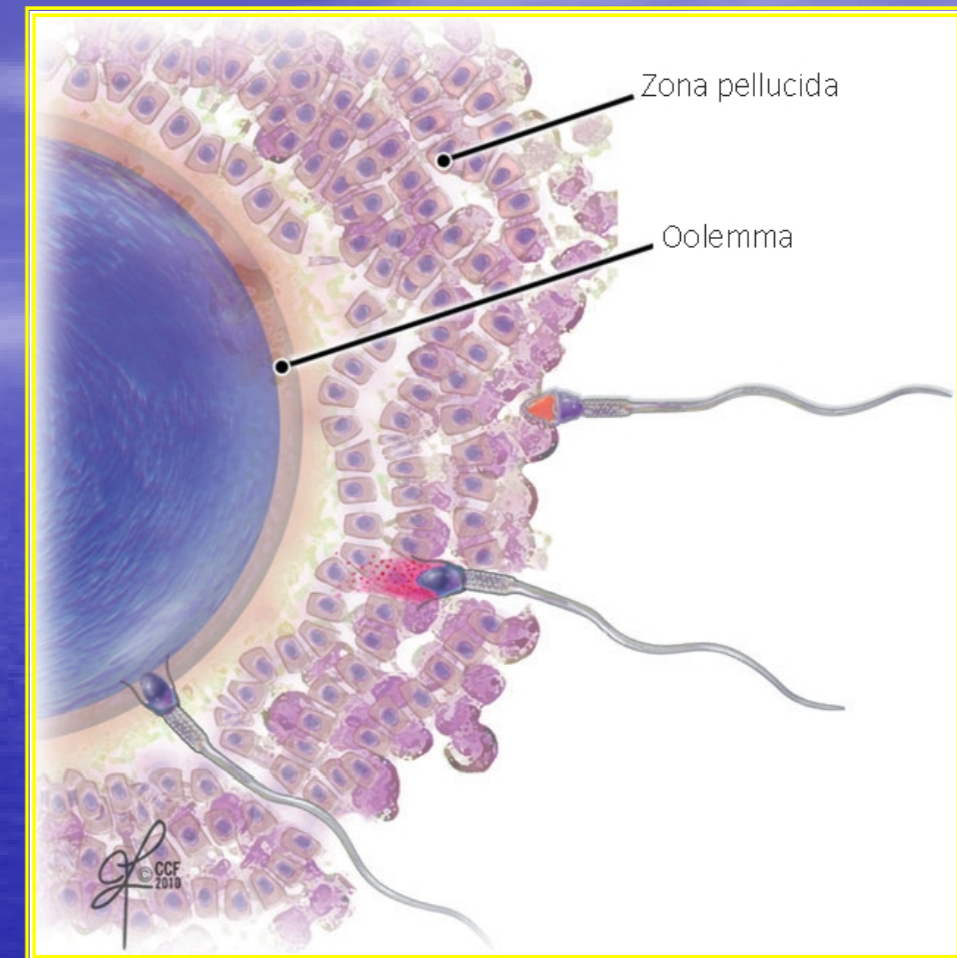
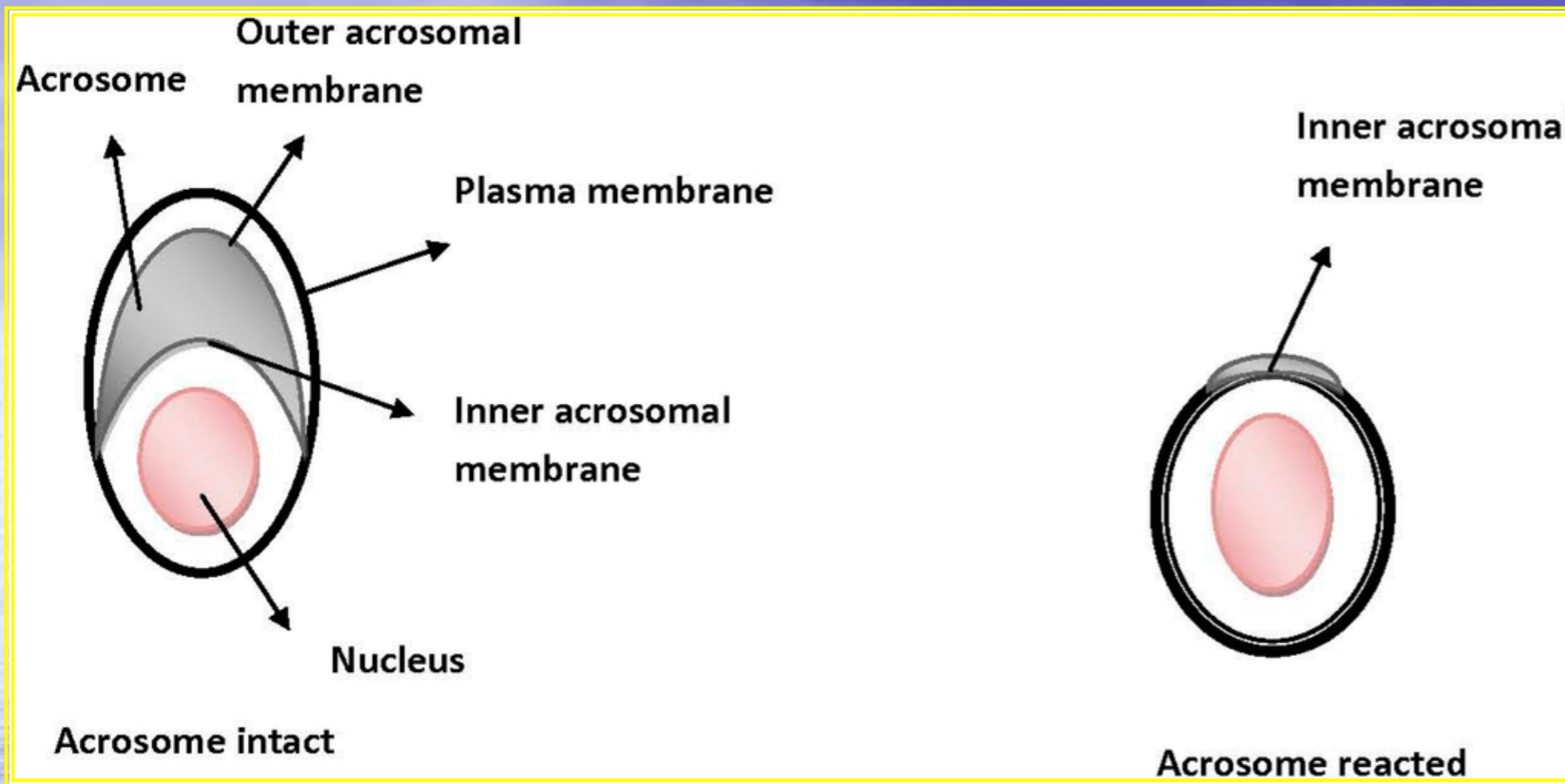


Δοκιμασία σύνδεσης με τη διαφανή ζώνη (Δοκιμασία ημιζώνης: hemizona assay)

- Απομόνωση PZ (ανθρώπινο ωάριο)
- Ημιδιατόμη PZ (εσωτ. συστ. ελέγχου)
- 1/2 PZ επώαση με σπέρμα ασθενούς: A
- 1/2 PZ επώαση με σπέρμα γόνιμου δότη (positive control): B
- Σήμανση με φθορίζουσα χρωστική
- Εκτίμηση A/B (<30%: παθολογικό)
- Παθολογική δοκιμασία συσχετίζεται με χαμηλά ποσοστά επιτυχίας IVF



Εκτίμηση συντίδρασης ακροσώματος

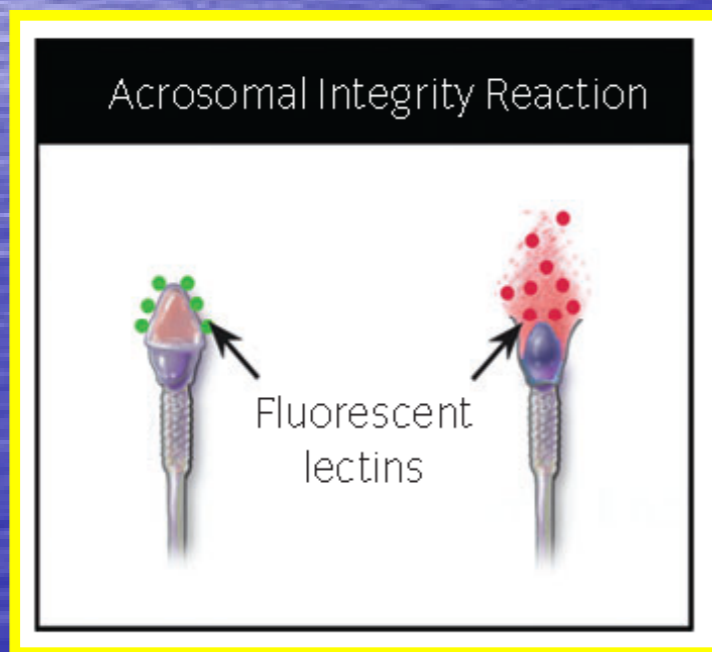
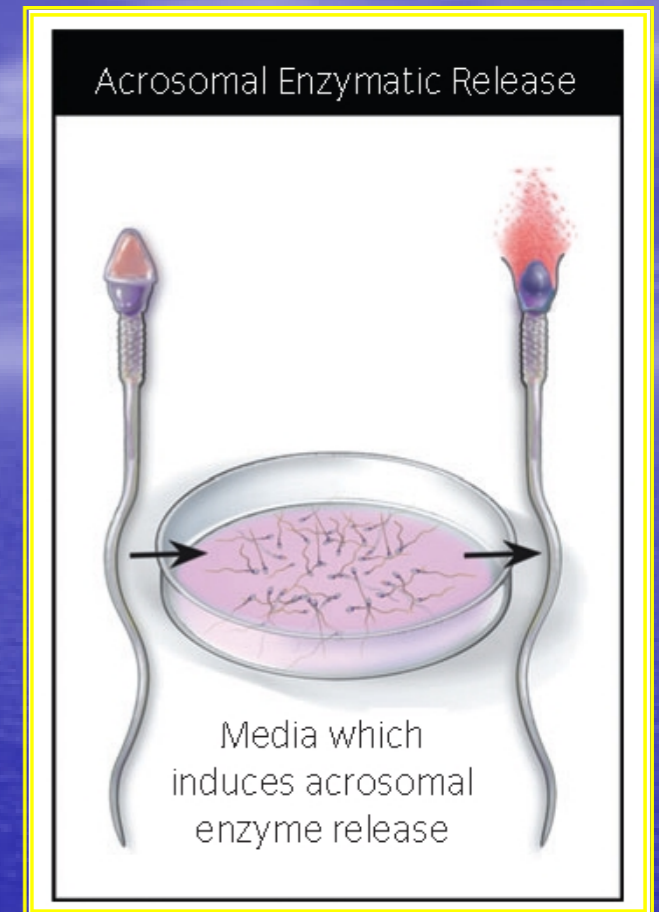


- Υδρόλυση εξωτερικής μεμβράνης ακροσώματος όταν συνδεθεί με ZP: ελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων (αντίδραση ακροσώματος)



Εκτίμηση αντίδρασης ακροσώματος

- In vitro πρόκληση με ακροσωμιακούς διεγέρτες [**ιονοφόρα** (A23187), ωοθυλακικό υγρό, P4, ZP]
- Μικροσκοπικός έλεγχος με φθορίζουσες λεκτίνες
- Εκτίμηση ποσοστού αντιδρόντων σπερμ/ζωαρίων



- Δείγματα με 5-30% αντιδρώντα σπερμ/ζωάρια έχουν υψηλότερο δυναμικό γονιμοποίησης
- Συσχέτιση βαθμού αντίδρασης – ποσοστού επιτυχίας IVF

- Ιδιοπαθής υπογον/σμός: 25% reaction failure



Δοκιμασία διεισδυτικότητας του σπερματοζωαρίου σε ετερόλογο ωάριο (zona-free hamster oocyte test)

- Ελέγχει το τελικό βήμα της γονιμοποίησης
- (σύνδεση με ωοκυτ. μεμβράνη-σύντηξη-είσοδος DNA)
- Πέψη ωοφόρου δίσκου – PZ ωαρίων hamster
- Επώαση με διηγεργμένα ανθρ. σπερματ/ζωάρια (αντίδραση ακροσώματος)
- Υπολογισμός ποσοστού ωαρίων που υπέστησαν διείσδυση ή μέσου αριθμού διεισδύσεων ανά ωάριο
- Συσχέτιση αποτελέσματος – ποσοστού επιτυχίας IVF
- Μεγάλο ποσοστό ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων



Προσδιορισμός ROS σπερματικού υγρού

- Σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων
- Σε υψηλές συγκεντρώσεις (>10%) προκαλούν οξειδωτική βλάβη στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της κυτταρικής μεμβράνης:
- Ασθενοσπερμία, διαταραχές σύντηξης με το ωάριο, οξειδωτικές βλάβες του DNA των σπερματοζωαρίων
- Αυξημένα επίπεδα στο 25-40% υπογόνιμων ανδρών
- Εκτίμηση οξειδωτικού stress σπερμ/ζωαρίων με χημειοφωταύγεια
- Η ενταση του σήματος συσχετίζεται αντίστροφα με τη γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων



Δοκιμασίες εκτίμησης ακεραιότητας DNA

- Οι αλλοιώσεις του DNA των σπερματοζωαρίων αποτελούν σημαντική αιτία υπογονιμότητας
- Ανώμαλη δομή χρωματίνης, μικροελλείψεις, ανευπλοειδίες, διάσπαση αλυσσίδων κ.λ.π.
- Μέγιστο επιτρεπτό όριο σπερματοζωαρίων με βλάβες DNA: 30%
- Εκτίμηση με διάφορες μεθόδους (άμεσα και έμμεσα)



Συμπερασματικά

- Αδυναμία διαχωρισμού γόνιμων-υπογόνιμων ανδρών
- Μη κατάδειξη αλλοιωμένων λειτουργικών παραμέτρων
 - δυνατότητα πρόσδεσης (Hyaluronic binding assay)
 - ενζυματική δράση (acrosin test)
 - βιωσιμότητα ακίνητων (hypo-osmotic swelling test)
 - διεισδυτική ικανότητα (penetration assay)
 - κατάσταση γενετικού υλικού (DFI, TUNEL, FISH)
- Η αυτοματοποίηση (CASA) έχει
 - περιορισμούς (εκτίμηση αριθμού – μορφολογίας)
 - πλεονεκτήματα (εκτίμηση υπερενεργοποίησης)
- Δε δίνει στοιχεία για γυναικείο παράγοντα (post-coital test)
- Η τελευταία έκδοση οδηγιών (WHO 2010) έχει εγείρει κριτικές για το κατά πόσο καλά οι τιμές αναφοράς αντικατοπτρίζουν τις επί μέρους εθνικές/γεωγραφικές πλυθυσμιακές ιδιαιτερότητες





Ευχαριστώ

