

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

Ο εργαστηριακός έλεγχος του σπέρματος περιλαμβάνει πολλές εργαστηριακές εξετάσεις, η κάθε μία από τις οποίες καλείται να απαντήσει σε μία συγκεκριμένη ερώτηση. Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα του ανδρολογικού εργαστηρίου θα επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό τις αποφάσεις του θεράποντος ιατρού (1).

Η βασική, βέβαια, εργαστηριακή εξέταση είναι το **σπερμοδιάγραμμα** στο οποίο, όμως είναι απαραίτητο να προστεθούν και άλλες εξετάσεις όπως:

- **μικροβιολογικές:** για τον έλεγχο της παρουσίας και του τύπου των μικροοργανισμών.

- **βιοχημικές:** για τον έλεγχο της λειτουργίας των επικουρικών γεννητικών αδένων.

- **ανοσολογικές:** για τον έλεγχο των αντισπερματικών αντισωμάτων στο σπέρμα.

- **λειτουργικές δοκιμασίες:** για τον έλεγχο των μηχανισμών που είναι απαραίτητοι για την γονιμοποίηση του ωαρίου.

- **μοριακής βιολογίας:** για τον έλεγχο της ποιότητας του DNA στον πυρήνα του σπερματοζωαρίου.

Η WHO έχει ταξινομήσει τις εργαστηριακές εξετάσεις του σπέρματος σε τρεις κατηγορίες:

1) Εξετάσεις ρουτίνας: Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται τα σπερμοδιάγραμμα και τα αντισπερματικά αντισώματα.

2) Προαιρετικές εξετάσεις: Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται εξετάσεις που δεν θεωρούνται απαραίτητες αλλά μπορεί να έχουν κλινική σημασία, όπως η δοκιμασία ζωτικότητας των σπερματοζωαρίων με υποοσμωτική διόγκωση της μεμβράνης τους, η καλλιέργεια του σπέρματος και ο βιοχημικός έλεγχος του σπερματικού υγρού.

3) Ερευνητικές εξετάσεις: Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι εξετάσεις σπέρματος που προς το παρόν χρησιμοποιούνται για ερευνητικούς σκοπούς, αλλά θα μπορούσαν στο μέλλον να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της γονιμοποιητικής ικανότητας του σπέρματος, συμπληρώνοντας ή αντικαθιστώντας τις εξετάσεις ρουτίνας. Τέτοιες εξετάσεις είναι ο προσδιορισμός των ελεύθερων ριζών στο σπερματικό υγρό, ο έλεγχος της δυνατότητας σύνδεσης των σπερματοζωαρίων με τη διαφανή ζώνη του ωαρίου και η ακροσωμιακή αντίδραση.

Σπερμοδιάγραμμα.

Η αρχική και ίσως η πιο βασική εξέταση του σπέρματος είναι το σπερμοδιάγραμμα. Πριν όμως μελετηθεί ένα δείγμα σπέρματος υπάρχουν ερωτήματα σχετικά με την εκσπερμάτιση.

Το σπερμοδιάγραμμα περιλαμβάνει την μακροσκοπική και την μικροσκοπική εξέταση:

α) Μακροσκοπική Εξέταση: ρευστοποίηση, γλοιότητα, όγκος, pH, παρουσία συγκολλήσεων-συσσωρεύσεων.

β) Μικροσκοπική Εξέταση: αριθμός σπερματοζωαρίων, αριθμός και αναγνώριση των μορφών, των στρογγυλών κυττάρων, κινητικότητα σπερματοζωαρίων, μορφολογία σπερματοζωαρίων, βιωσιμότητα σπερματοζωαρίων.

Ένα φυσιολογικό δείγμα σπέρματος, με βάση τα μέχρι σήμερα δεδομένα της WHO, πρέπει να έχει >20 εκατομμύρια/ml, ζωηρή προωθητική κινητικότητα >25% και φυσιολογικές μορφές σπερματοζωαρίων >15%. Σε πολλές περιπτώσεις όμως ο άνδρας μπορεί να επιτύχει σύλληψη, ακόμη και εάν έχει λιγότερο από 20 εκατομμύρια/ ml ή λιγότερο από 25% καλώς κινούμενων σπερματοζωαρίων.

Μέτρηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων.

Για τη μέτρηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων πρώτα αραιώνεται το δείγμα του σπέρματος με ειδικό υλικό και κατόπιν γίνεται η μέτρηση του αριθμού με τη χρήση του κυτταρόμετρου Neubauer. Το κυτταρόμετρο Makler είναι εύκολο και γρήγορο στη χρήση του και η μέτρηση γίνεται χωρίς αραιώση του σπέρματος. Οι μετρήσεις παρουσιάζουν μη αποδεκτή ακρίβεια και επαναληψιμότητα, με συνέπεια να μη συνιστάται η χρήση του κυτταρόμετρου αυτού (3).

Μέτρηση και αναγνώριση των μορφών των στρογγυλών κυττάρων.

Στο κυτταρόμετρο Neubauer εκτός από τον αριθμό των σπερματοζωαρίων προσδιορίζεται και ο αριθμός των στρογγυλών κυττάρων του δείγματος. Τα κύτταρα αυτά μπορεί να είναι είτε κύτταρα της λευκής σειράς ή κύτταρα της σπερματικής σειράς. Το αποτέλεσμα πρέπει να δίνεται σε εκατομμύρια / ml και όχι «κατά οπτικό πεδίο». Η αναφορά « κατά οπτικό πεδίο» περιγράφει μια υποκειμενική εκτίμηση που εξαρτάται από τον όγκο της σταγόνας που ελέγχεται , το μέγεθος της καλυπτρίδας, το αριθμητικό άνοιγμα του μικροσκοπίου και του προσοφθάλμιου φακού και ως εκ τούτου δεν μπορεί να αξιολογηθεί.

Η τιμή αναφοράς για τα κύτταρα της λευκή σειράς είναι λιγότερα από ένα εκατομμύριο /ml, ενώ δεν υφίσταται τιμή αναφοράς για τα κύτταρα της σπερματικής σειράς.

Στη νωπή σταγόνα του δείγματος που παρατηρούμε στο μικροσκόπιο δεν μπορεί να γίνει ο διαχωρισμός των στρογγυλών κυττάρων σε κύτταρα της λευκής ή της σπερματικής σειράς. Η διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων πρέπει να γίνεται με τη μέθοδο της υπεροξειδάσης ή με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων. Αντίθετα, η μέθοδος της υπεροξειδάσης αν και δεν μπορεί να καθορίσει τον τύπο του κυττάρου της σπερματικής σειράς, μπορεί να διαχωρίσει τα κοκκώδη από τα μη κοκκώδη κύτταρα (4).

Μέτρηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων.

Παρατηρούνται τέσσερις τύποι κίνησης των σπερματοζωαρίων: η ζωηρή προωθητική, η νωθρή προωθητική, η επιτόπια κίνηση και τα ακίνητα σπερματοζωάρια. Η κινητικότητα επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως: η

θερμοκρασία του δωματίου, η καλή ανάδευση του δείγματος, η ομοιόμορφη κατανομή στο μικροσκόπιο και το βάθος του οπτικού πεδίου. Η μέτρηση της κινητικότητας εξαρτάται ακόμη και από εξωγενείς παράγοντες όπως ακόμη και ο τρόπος μέτρησης του όγκου (6).

Η μέτρηση της κινητικότητας μπορεί επίσης να γίνει με τη χρήση αυτόματων αναλυτών. Η κινητικότητα με την χρήση του αναλυτή μπορεί να μετρηθεί με μεγάλη επαναληψιμότητα και μπορούν επίσης να μετρηθούν παράμετροι της κινητικότητας που δεν μετριοούνται με το γυμνό μάτι, όπως η μέση ταχύτητα της ελικοειδούς πορείας η μέση ταχύτητα της ευθύγραμμης κίνησης, η μέση προωθητική ταχύτητα και το εύρος της προς τα πλάγια κίνησης των κεφαλών. Επίσης μπορούν ακόμη να μετρήσουμε τον αριθμό των σπερματοζωαρίων. Η μέτρηση της ζωτικότητας των σπερματοζωαρίων μπορεί να γίνει επίσης και με τη δοκιμασία της υποοσμωτικής διόγκωσης που αναπτύχθηκε το 1984 από τον Jeyendran (9). Η μέτρηση αυτή προσδιορίζει και πάλι το ποσοστό των ζωντανών σπερματοζωαρίων με βάση την ακεραιότητα της μεμβράνης στην ουρά του σπερματοζωαρίου. Τα σπερματοζωάρια σε αυτή την περίπτωση τοποθετούνται μέσα στον υποοσμωτικό διάλυμα για μισή ώρα και ως αποτέλεσμα το νερό περνάει μέσα από την μεμβράνη και δημιουργεί διόγκωση στην περιοχή της ουράς. Τα σπερματοζωάρια που παρουσιάζουν αυτή τη διόγκωση θεωρούνται ζωντανά, ενώ εάν δεν υπάρχει αλλοίωση στην ουρά το σπερματοζωάριο θεωρείται νεκρό (10).

Μέτρηση της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων.

Η WHO συστήνει την χρήση της μεθόδου κατά Παπανικολάου ή την χρώση Shorr, με τις οποίες μπορεί να εκτιμηθεί το μέγεθος και το σχήμα της κεφαλής, του αυχένα και της ουράς του σπερματοζωαρίου. Η μορφολογία είναι η πιο απαιτητική από τις μετρήσεις του σπερμοδιαγράμματος λόγω του χρόνου που απαιτείται για να γίνει η χρώση του επιχρίσματος των σπερματοζωαρίων. Η εκτίμηση της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων προϋποθέτει μακροχρόνια εκπαίδευση και εμπειρία. Είναι γεγονός ότι υπάρχουν πάρα πολλές μορφολογικές ανωμαλίες στο σπερματοζωάριο που δεν αναφέρονται χωριστά. Θεωρείται ότι ένα σπερματοζωάριο έχει φυσιολογική μορφολογία όταν η κεφαλή, ο αυχένος και η ουρά πληρούν τα κριτήρια της φυσιολογικότητας (11,12).

Έλεγχος των αντισπερματικών αντισωμάτων στο σπέρμα.

Στις εξετάσεις ρουτίνας της WHO συμπεριλαμβάνεται και η μέτρηση των αντισπερματικών αντισωμάτων στο σπέρμα, που μπορεί να ανήκουν στην κατηγορία IgG ή IgA. Οι τρόποι για τη μέτρηση των αντισπερματικών αντισωμάτων, που προτείνονται από την WHO είναι η δοκιμασία IBT και η δοκιμασία MAR. Και στις δύο μεθόδους ελέγχονται καλώς κινούμενα σπερματοζωάρια και το αποτέλεσμα της δοκιμασίας θεωρείται θετικό όταν >50% των κινούμενων σπερματοζωαρίων έχουν προσκολλημένα σφαιρίδια επάνω τους. Η παρουσία

αντισπερματικών αντισωμάτων στο σπέρμα έχει συσχετισθεί με την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (13), ενώ δεν έχει αποδειχθεί ανάλογη συσχέτιση με το αποτέλεσμα της IVF (14).

Μικροβιολογικές και βιοχημικές εξετάσεις σπέρματος.

Εκτός από το σπερμοδιάγραμμα υπάρχουν πολλές ακόμη εργαστηριακές εξετάσεις του σπέρματος, όπως η καλλιέργεια του σπέρματος και ο βιοχημικός έλεγχος του σπερματικού υγρού, οι οποίες είναι προαιρετικές και επιλέγονται εξατομικευμένα.

Καλλιέργεια του σπέρματος

Η καλλιέργεια του σπέρματος γίνεται για τον έλεγχο ύπαρξης μικροοργανισμών στο ανδρικό γεννητικό σύστημα, δεδομένου ότι είναι δυνατόν να αναπτυχθούν παθογόνα μικρόβια και να επηρεάσουν τη γονιμοποιητική ικανότητα του δείγματος (15,16). Συνήθως, ελέγχεται η παρουσία αερόβιων και αναερόβιων μικροοργανισμών καθώς και η παρουσία μυκοπλάσματος, ουρεοπλάσματος και χλαμυδίων. Η αερόβια καλλιέργεια στρώνεται σε τρυβλία με άγαρ στο οποίο αναπτύσσονται αποικίες μικροοργανισμών. Ανάλογα γίνεται και η αναερόβια καλλιέργεια κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Οι καλλιέργειες μπορεί να γίνουν πιο ευαίσθητες εάν αρχικά γίνει φυγοκέντρηση του δείγματος και κατόπιν χρησιμοποιηθεί το ίζημα για την καλλιέργεια (17).

Βιοχημικός έλεγχος του σπέρματος

Οι βιοχημικές εξετάσεις του σπέρματος δίνουν πληροφορίες για τη λειτουργία των επικουρικών γεννητικών αδένων. Πιο συγκεκριμένα μπορούν να μετρηθούν: Για τη λειτουργία του προστάτη: η όξινη φωσφατάση, το κιτρικό όξύ, ο ψευδάργυρος και το μαγνήσιο. Η μέθοδος επιλογής είναι συνήθως η μέτρηση της όξινης φωσφωτάσης (24). Για τη λειτουργία των σπερματικών κύστεων: η φρουκτόζη και οι προσταγλανδίνες. Η μέθοδος προσδιορισμού είναι η φωτομετρική και γίνεται σε σπερματικό πλάσμα χωρίς κύτταρα και πρωτεΐνες μετά από αραίωση (25). Για τη λειτουργία των επιδιδυμίδων: η ουδέτερη α-γλυκοσιδάση, η καρνιτίνη και η γλυκερυλ-φωσφωρυλ-χολίνη. Η μέθοδος επιλογής είναι η μέτρηση της ουδέτερης α-γλυκοσιδάσης, δεδομένου ότι η ουδέτερη μορφή παράγεται αποκλειστικά από τις επιδιδυμίδες (27).

Λοιπές εργαστηριακές εξετάσεις.

Οι λοιπές εργαστηριακές εξετάσεις είναι: η ακροσωμιακή αντίδραση, η δοκιμασία της διείσδυσης του σπερματοζωαρίου σε ετερόλογο ωάριο, τον προσδιορισμό των ελεύθερων ριζών στο σπερματικό υγρό, την ικανότητα του σπερματοζωαρίου να συνδεθεί με την διαφανή ζώνη του ωαρίου, την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης και της μικροελλείψεις στο Υ χρωμόσωμα (28).

Ακροσωματική αντίδραση

Η ακροσωματική αντίδραση γίνεται αμέσως μετά την σύνδεση της κεφαλής του σπερματοζωαρίου με την επιφάνεια της διαφανούς ζώνης και οδηγεί στην εξωκύτωση ενζύμων. Τα ένζυμα αυτά δημιουργούν μία δίοδο έτσι ώστε το σπερματοζωάριο να διαπεράσει την διαφανή ζώνη και να εισχωρήσει στο ωάριο. Τα σπερματοζωάρια που έχουν ολοκληρώσει την ακροσωματική αντίδραση διαφέρουν από τα ακέραια σπερματοζωάρια. Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση τη διαφορετική εικόνα που παρουσιάζουν στο μικροσκόπιο μετά από χρώση με συνδυασμό τριών χρωμάτων, μία μέθοδο που ανέπτυξαν ο Taibot και ο Chacon (29). Τα σπερματοζωάρια που έχουν ολοκληρώσει την ακροσωματική αντίδραση μπορούν ακόμη να αναγνωρισθούν και με τη χρήση λεκτινών ή αντισωμάτων επισημασμένων με ανοσοφθορισμό (30,31).

Δοκιμασία της διείσδυσης του σπερματοζωαρίου σε ετερόλογο ωάριο

Η δοκιμασία αυτή διερευνά τη δυνατότητα του σπερματοζωαρίου να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη του ωαρίου και αφού εισέλθει στο εσωτερικό του ωαρίου να σχηματίσει τον άρρενα προπυρήνα (34). Στη δοκιμασία αυτή το δείγμα των σπερματοζωαρίων επωάζεται με ωάρια από ινδικά χοιρίδια ύστερα από την απομάκρυνση της διαφανούς ζώνης και εκτιμάται το ποσοστό των σπερματοζωαρίων που μπορούν να διεισδύσουν μέσα στο ωάριο του ινδικού χοιριδίου και να το γονιμοποιήσουν. Ο αριθμός αυτός των σπερματοζωαρίων ενώ εξαρτάται από τον αριθμό τους στο δείγμα, δεν σχετίζεται με τη μορφολογία τους (35). Ο μηχανισμός εισόδου από την κυτταρική μεμβράνη στο ωάριο του ινδικού χοιριδίου είναι ο ίδιος με του ανθρώπου με τη διαφορά ότι δεν περιβάλλεται από τη διαφανή ζώνη. Η έλλειψη, λοιπόν, απόλυτη συσχέτισης της διείσδυσης του σπερματοζωαρίου στο ωάριο του ινδικού χοιριδίου με τη σύλληψη μπορεί πιθανά να εξηγηθεί από την απουσία της διαφανούς ζώνης (36).

Προσδιορισμός των ελεύθερων ριζών στο σπερματικό υγρό

Οι ελεύθερες ρίζες συμπεριλαμβάνουν μεταβολίτες του οξυγόνου και όταν βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλούν βλάβη στα λιπίδια της μεμβράνης, στις πρωτεΐνες και στο DNA (37,38). Τα περισσότερα κύτταρα είναι εφοδιασμένα με ενζυματικούς ή αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, που παρέχουν προστασία στα κύτταρα από την παρουσία των ελεύθερων ριζών. Σε περιπτώσεις που οι μηχανισμοί προστασίας δεν αρκούν ή είναι ελλιπείς (39) οι ελεύθερες ρίζες που υπάρχουν στο δείγμα του σπέρματος θα επηρεάσουν την γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις των ελεύθερων ριζών έχουν επίσης συσχετισθεί με πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον μηχανισμό του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (40). Ο μηχανισμός αυτός της απόπτωσης μπορεί να εξηγήσει τις ελαττωμένες παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος σε υπογόνιμους άνδρες με αυξημένα επίπεδα ελεύθερων

ριζών.

Ικανότητα του σπερματοζωαρίου να συνδεθεί με τη διαφανή ζώνη του ωαρίου

Για να διαπιστωθεί εάν το σπερματοζωάριο έχει αυτή την ικανότητα χρησιμοποιούνται ωάρια που δεν γονιμοποιήθηκαν στο IVF, που διατηρούνται σε διαλύματα με υψηλή συγκέντρωση ρυθμιστικών αλάτων για μήνες (41). Τα ωάρια αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν με δύο τρόπους:

α) στη μέτρηση ημιζώνης, το ωάριο διαιρείται στη μέση μηχανικά ή με τη χρήση ειδικών οργάνων laser (42) και το ένα ήμισυ επωάζεται με τα σπερματοζωάρια από το προς εξέταση δείγμα ενώ το άλλο ήμισυ επωάζεται με σπερματοζωάρια που έχουν αποδείξει τη γονιμοποιητική τους ικανότητα. Κατόπιν υπολογίζεται ο αριθμός των σπερματοζωαρίων του δείγματος που συνδέθηκαν με το ένα ήμισυ και συγκρίνεται με τον πληθυσμό των σπερματοζωαρίων-μαρτύρων (43).

β) στην ανταγωνιστική δέσμευση ζώνης, το ωάριο επωάζεται ολόκληρο με δύο πληθυσμούς σπερματοζωαρίων, ο ένας αποτελείται από τα σπερματοζωάρια του δείγματος και ο άλλος από σπερματοζωάρια του μάρτυρα. Οι δύο αυτοί πληθυσμοί έχουν επισημανθεί με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές και το αποτέλεσμα δίνεται ως αναλογία των συνδεδεμένων σπερματοζωαρίων του δείγματος προς το μάρτυρα (44).

Αποσυμπύκνωση της χρωματίνης και ωριμότητα του πυρήνα.

Όπως είναι γνωστό το DNA που βρίσκεται στον πυρήνα των κυττάρων είναι ενωμένο με ιστόνες, βασικές πρωτεΐνες πλούσιες στο αμινοξύ λυσίνη. Το DNA στον πυρήνα του σπερματοζωαρίου παρουσιάζει μια ιδιομορφία: οι ιστόνες έχουν αντικατασταθεί από μια άλλη κατηγορία πρωτεϊνών, τις πρωταμίνες, που είναι επίσης βασικές πρωτεΐνες, πλούσιες όμως στα αμινοξέα αργινίνη και κυστεΐνη. Οι αλλαγές αυτές επιτελούνται καθώς το σπερματοζωάριο διέρχεται κατά μήκος του αυλού της επιδιδυμίδας. Στη διαδρομή αυτή, οι πρωταμίνες οξειδώνονται και δημιουργούνται δισουφλιδικοί δεσμοί με αποτέλεσμα τη συμπύκνωση της χρωματίνης του πυρήνα. Ως αποτέλεσμα ο όγκος του πυρήνα του σπερματοζωαρίου γίνεται πολύ μικρότερος από τους πυρήνες των υπόλοιπων κυττάρων και αποκτά ανθεκτικότητα σε χημικούς παράγοντες. Αφού το σπερματοζωάριο εισχωρήσει στο ωάριο για να γίνει η γονιμοποίησή του, πρέπει το γενετικό υλικό του σπερματοζωαρίου να υποστεί αποσυμπύκνωση ώστε να ενωθεί με το γενετικό υλικό του ωαρίου.

Υπάρχουν πολλές δοκιμασίες με τις οποίες μπορεί να ελεγχθεί η συμπύκνωση της χρωματίνης του πυρήνα. Μία απλή δοκιμασία, είναι η δοκιμασία ανιλίνης. Η ανιλίνη αντιδρά με τη λυσίνη και έτσι οι ανώριμοι πυρήνες που, ενώ δεν πρέπει, περιέχουν λυσίνη βάφονται κυανοί ενώ οι ώριμοι μένουν άχρωμοι (45,46). Η ωριμότητα του πυρήνα μπορεί επίσης να επηρεάσει τη γονιμοποιητική ικανότητα ενός δείγματος. Το φυσιολογικό DNA είναι, ως γνωστόν, δίκλωνο, εάν όμως

υποστεί μετουσίωση γίνεται μονόκλωνο. Ο έλεγχος που θα καθορίσει εάν το DNA είναι μονόκλωνο ή δίκλωνο γίνεται με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής της ακριδίνης(52). Όταν το DNA του πυρήνα του σπερματοζωαρίου είναι δίκλωνο τότε η ακριδίνη φθορίζει σε πράσινο χρώμα ενώ όταν το DNA είναι μονόκλωνο ο πυρήνας φθορίζει σε κόκκινο χρώμα. Έχει αποδειχθεί ότι οι γόνιμοι άνδρες διαφέρουν από τους υπογόνιμους όσον αφορά την ωριμότητα του πυρήνα των σπερματοζωαρίων (53,54) η οποία έχει συνδεθεί επίσης με το αποτέλεσμα της IVF (55).

Μικροελλείψεις στο χρωμόσωμα Y

Το 1976 ο Tierpolo και ο Zuffardi για πρώτη φορά ανακοίνωσαν ελλείψεις στο χρωμόσωμα Y, που προκαλούσαν υπογονιμότητα (56). Δεδομένου ότι ο φαινότυπος στην πλεινότητα των περιπτώσεων είναι αυτός της αζωοσπερμίας, η περιοχή ονομάστηκε AZF. Στη χαρτογράφηση του Yp11 αναγνωρίστηκαν τρεις περιοχές με ελλείψεις που ονομάζονται αντίστοιχα AZFa, AZFd και AZFc (57). Ανάμεσα στα γονίδια που βρίσκονται σε αυτές τις περιοχές του Y και επηρεάζουν τη σπερματογένεση είναι τα DBY, USP9Y, RBM και DAZ (58).

Η σχετικά σπάνια έλλειψη της περιοχής AZFa ή AZFd εκδηλώνεται με εικόνα απλασίας του σπερματικού επιθηλίου ή με εικόνα διακοπής της σπερματογένεσης. Σε αυτούς τους ασθενείς συνήθως δεν βρίσκονται σπερματοζωάρια μετά από προσπάθεια λήψης από τους όρχεις (59). Αντίθετα, στην αρκετά συχνότερη έλλειψη της περιοχής AZFc, ο φαινότυπος ποικίλει από αζωοσπερμία μέχρι ολιγο-τερατο-ασθενοσπερμία. Φαίνεται δηλαδή ότι τα γονίδια της περιοχής AZFc είναι υπεύθυνα για τη σπερματογένεση (57). Η ποικιλία των φαινοτύπων θα μπορούσε να εξηγηθεί από την ύπαρξη περιπτώσεων με μωσαϊκισμό (60).

Η διερεύνηση των μικροελλείψεων στο χρωμόσωμα Y θεωρείται χρήσιμη, ιδιαίτερα στους άνδρες που παρουσιάζουν αζωοσπερμία ή βαρειάς μορφής ολογοτρατοσπερμία (61). Οι περισσότερες από τις Yp μικροελλείψεις είναι de novo, εμφανίστηκαν, δηλαδή, ως μετάλλαξη στο συγκεκριμένο άνδρα, χωρίς να προϋπάρχουν στον πατέρα του. Εφόσον ο άνδρας αυτός επιλέξει να κάνει παιδιά με τη μέθοδο ICSI τα αγόρια πιθανόν θα κληρονομήσουν τις Yp μικροελλείψεις και θα παρουσιάσουν τα ίδια προβλήματα γονιμότητας κατά την ενήλικη ζωή τους. Είναι λοιπόν ιδιαίτερα σημαντικό το ζευγάρι να ενημερωθεί σωστά και έγκαιρα για τη σημασία των Yp μικροελλείψεων (62).

Ποιοτικός έλεγχος του ανδρολογικού εργαστηρίου.

Ο σκοπός του ποιοτικού ελέγχου είναι να ανιχνεύσει και να διορθώσει τα λάθη που παρουσιάζονται τυχαία ή συστηματικά. Ως παράδειγμα αξίζει να αναφέρουμε την εμπειρία του Knuth, ο οποίος παρατήρησε απότομη πτώση στις τιμές της κινητικότητας όλων των δειγμάτων. Ο λόγος αποδείχθηκε ύστερα από τον ποιοτικό έλεγχο ότι ήταν η πρακτική ενός εργαστηριακού να μετράει τον όγκο του δείγματος

με σύριγγα τη βελόνα προσαρμοσμένη (6). Τα τυχαία λάθη αυξάνουν τη διασπορά, επηρεάζουν την επαναληψιμότητα των μετρήσεων και ανιχνεύονται με πολλές επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Αντίθετα τα συστηματικά λάθη προκαλούν απόκλιση της τιμής προς μία συγκεκριμένη κατεύθυνση και δεν μπορούν να ανιχνευθούν με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Γενικά λάθη μπορεί να προκύψουν από κακή ανάμειξη σε δείγματα με αυξημένη γλοιότητα, από κακή πρακτική του εργαστηριακού. Το αποτέλεσμα είναι πολύ πιο αξιόπιστο όταν μετριοούνται μεγάλοι αριθμοί σπερματοζωαρίων. Στα πλαίσια του ποιοτικού ελέγχου γίνεται έλεγχος των μηχανημάτων, όπως οι πιπέτες, οι ζυγοί και οι κλίβανοι τόσο ως προς τη θερμοκρασία όσο και ως προς το μίγμα αερίων που χρησιμοποιείται.

Ο ποιοτικός έλεγχος των αποτελεσμάτων διακρίνεται σε εσωτερικό και εξωτερικό (63). Ο στόχος του εσωτερικού ποιοτικού ελέγχου είναι να ελέγξει ο κάθε εργαστηριακός τον εαυτό του. Κάθε επιστήμονας μετράει το ίδιο δείγμα πολλές φορές και καταγράφει την απόκλιση που παρουσιάζουν οι τιμές. Στον εξωτερικό ποιοτικό έλεγχο το ίδιο δείγμα μετριέται από εργαστηριακούς διαφορετικών εργαστηρίων (64). Τέτοια συστήματα εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου υπάρχουν ήδη σε αρκετά κράτη, όπως η Γαλλία και το Βέλγιο και γίνονται προσπάθειες να δημιουργηθούν και σε άλλα (65).

Έλεγχος του σπέρματος

Βιβλιογραφία:

1. McLachlan RI, Baker HW, Clarke GN, et al, 2003 Semen analysis: its place in modern reproductive medical practice. *Pathol* 35:25-33.
3. World Health Organization, 1999 WHO Manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 4th Edition, Geneva.
4. Rodin DM, Larone D, Goldstein M, 2003 Relationship between semen cultures, leucospermia, and semen analysis in men undergoing fertility evaluation. *Fertil Steril* 79(Suppl 3):1555-1558.
6. Knuth UA, Neuwinger J, Nieschlag E, 1989 Bias to routine semen analysis by uncontrolled changes in laboratory environment-detection by long-term sampling of monthly means for quality control. *Int J Androl* 12:375-383.
9. Jeyendran RS, van der Ven HH, Perez-Palaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD, 1984 Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to the other semen characteristics. *J Reprod Fertility* 70:219-228.
10. Drevious L, Eriksson H, 1996 Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Exper Cell Res* 42:136-156.
11. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RL, Matta JF, Oehninger S, 1988 Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 49:112-117.
12. Panidis D, Matalliotakis I, Skiadopoulou S, Rousso D, Koumantakis E, Mamopoulos

- M, 1998 The sperm deformity and multiple anomalies indices: are they reliable in the identification of fertile and infertile semen. *Int J Fertil Women Med* 43:159-164.
- 13.-- Shibahara H, Shiraishi Y, Hirano Y, Suzuki T, Takamizawa S, Suzuki M, 2003 Diversity of the inhibitory effects on fertilization by anti-sperm antibodies bound to the surface of ejaculated human sperm. *Hum Reprod* 18:1469-1473.
14. Shibahara H, Hirano Y, Takamizawa S, Sato I, 2003 Effect of sperm-immobilizing antibodies bound to the surface of ejaculated human spermatozoa on sperm motility in immunologically infertile men. *Fertil Steril* 79:641-642.
15. Stovall DW, Bailey LE, Talbert LM, 1993 The role of aerobic semen cultures in asymptomatic couples undergoing in vitro fertilization: effects on fertilization and pregnancy rates. *Fertil Steril* 59:197-201.
16. Keck C, Gerber-Schafer C, Clad A, Wilhelm C, Breckwoldt M, 1998 Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. *Hum Reprod Update* 4:891-903.
17. Vollanueva- Diaz CA, Flores-Reyes GA, Beltran-Zunuga M, Echavarría-Sánchez M, Ortiz-Ibarra FJ, Arredondo-García JL, 1999 Bacteriospermia and male infertility: a method for increasing the sensitivity of semen culture. *Int J Women Med* 44:198-203.
24. Heite HJ, Wetterauer W, 1979 Acid phosphatase in seminal fluid: method of estimation and diagnostic significance. *Androl* 11:113-122.
25. Gonzales GF, 1994 Corrected seminal fructose test. *Arch Androl* 33:17-22.
27. Cooper TG, Yeung CH, Nashan D, Jockenhovel F, Nieschlag E, 1990 Improvement in the assessment of human epididymal function by the use of inhibitors in the assay of α -glucosidase in seminal plasma. *Int J Androl* 13:297-305.
28. Roy S, Banerjee A, Pandey HC, Singh G, Kumari GL, 2001 Application of seminal germ cell morphology and semen biochemistry in the diagnosis and management of azoospermic subjects. *Asian J Androl* 3:55-62.
29. Tallbot P, Chacon RS, 1980 A new procedure for rapidly scoring acrosome reactions of human sperm. *Gamete Res* 3:211-216.
30. Kawamoto A, Ohashi K, Kishikawa H, Zhu LQ, Azuma C, Murata Y, 1999 Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD 46 antibody to assess acrosomal status. *Fertil Steril* 71:497-501.
31. Kohn FM, Mack SR, Schill WB, Zaneveld LJ, 1997 Detection of human sperm acrosome reaction: comparison between methods using double staining. *Pisum sativum* agglutinin, concanavalin A and transmission electron microscopy. *Hum Reprod* 12:714-721.
34. Drobniš EZ, Yudin AL, Cherr GN, Katz DF, 1988 Hamster sperm penetration of the zona pellucida: kinematic analysis and mechanical implications. *Develop Biol* 130:311-323.
35. Zahalsky MP, Zoltan E, Medley N, Nagler HM, 2003 Morphology and the sperm penetration assay. *Fertil Steril* 79:39-41.

36. Montoya JM, Bernal A, Borreco C, 2002 Diagnostics in assisted human reproduction. *Reprod Biomed Online* 5:198-210.
37. Aitken RJ, West KM, 1990 Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Int J Androl* 13:433-451.
38. Griveau JF, LeLannou D, 1997 Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 20:61-69.
39. Smith R, Vantman D, Ponce J, Escobar J, Lissi E, 1996 Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Hum Reprod* 11:1655-1660.
40. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ, Jr, Falcone T, Agarwal A, 2003 Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 80:531-535.
41. Yanagimachi R, Lopata A, Odom CB, Bronson RA, Machi CA, Nicolson AL, 1979 Retention of biologic characteristics of zona pellucida in highly concentrated salt solution: the use of salt stored eggs for assessing the fertilizing capacity of spermatozoa. *Fertil Steril* 31:562-574.
42. Edenfeld J, Schopper B, Sturm R, Diedrich K, Al-Hasani S, 2002 Application of a 1.48-micron diode laser for dissecting oocytes into two identical hemizonae for the hemizona assay. *Int J Androl* 25:100-105.
43. Burkman LJ, Kruger TF, Coddington CC, Rosenwaks Z, Franken DR, Hodgen GD, 1988 The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertil Steril* 49:688-697.
44. Liu DY, Lopata A, Johnston WIH, Baker HWG, 1988 A human spermazona pellucida binding test using oocytes that failed to fertilize in-vitro. *Fertil Steril* 50:782-788.
45. Dadoune JP, Mayaux MJ, Guihard-Moscato ML, 1988 Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Androl* 20:211-217.
46. Hofmann N, Hilscher B, 1991 Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. *Hum Reprod* 6:979-982.
52. Eggert-Kruse W, Rohr G, Kerber H, et al, 1996 The Acridine Orange test: a clinically relevant screening method for sperm quality during infertility investigation? *Hum Reprod* 11:784-789.
53. Ibrahim ME, Moussa MA, Pedersen H, 1988 Sperm chromatin heterogeneity as an infertility factor. *Arch Androl* 21:129-133.
54. Gopalkrishnan K, Hurkadi K, Padwal V, Balaiah D, 1999 Use of acridine orange to evaluate chromatin integrity of human spermatozoa in different groups of integrity of human spermatozoa in different groups of infertile men. *Androl* 31:277-282.
55. Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, Kimura Y, Sato A, 1996 The relationship

between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilization ability of human sperm. *Fertil Steril* 66:634-639.

56. Tiepolo L, Zuffardi O, 1976 Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 34:119-124.

57. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, et al, 1996 Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 5:933-943.

58. Silber SJ, Repping S, 2002 Transmission of male infertility to future generations: lessons from the Y chromosome. *Hum Reprod Update* 8:217-229.

59. Schleg P, 2002 The Y chromosome. *RBM onlin* 5:22-25.

60. Kent-First MG, Kol S, Muallem A, et al, 1996 The incidence and possible relevance of Y-linked microdeletions in babies born after intracytoplasmic sperm injection and their infertile fathers. *Mol Hum Reprod* 12:943-950.

61. Simoni M, Bakker E, Eurlings MCM, et al, 1999 Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. *Int J Androl* 22:292-299.

62. Johnson MD, 1999 Genetic risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. *Fertil Steril* 70:397-341.

63. Clements S, Cooke ID, Barratt CLR, 1995 Implementing comprehensive quality control in the andrology laboratory. *Hum Reprod* 10:2096-2106.

64. Matson PL, 1995 External quality control assessment for semen analysis and sperm antibody detection: results of a pilot scheme. *Hum Reprod* 10:620-625.

65. Keel BA, 2002 Quality control, quality assurance, and proficiency testing in the andrology laboratory. *Arch Androl* 48:417-431.