

Ανδρική υπογονιμότητα και γενετικές επιπτώσεις της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής

ΕΛ. ΚΟΝΤΟΓΙΑΝΝΗ

Η ανδρική υπογονιμότητα, ένα άλτο στο παρελθόν πρόβλημα για την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, αντιμετωπίζεται σήμερα με την ανάπτυξη νέων τεχνικών. Η τεχνική της Μικροχειρουργικής Ωαρίου (ICSI) έχει φέρει επανάσταση στη θεραπεία ανδρών με πολύ φτωχές παραμέτρους σπέρματος ή προηγούμενες αποτυχημένες προσπάθειες γονιμοποίησης. Επιπλέον, η μέθοδος ICSI σε συνδυασμό με χειρουργικές μεθόδους λήψης σπερματοζωαρίων, όπως βιοψία από ορχικό επιθήλιο (TESE) ή επιδιδυμίδα (MESA), έχει βοηθήσει περιπτώσεις αποφρακτικής ή μη-αποφρακτικής αζωοσπερμίας. Σπερματίδες και δευτερογενή σπερματοκύτταρα έχουν χρησιμοποιηθεί σε μερικές περιπτώσεις μη-αποφρακτικής αζωοσπερμίας. Παρόλο το αυξημένο ποσοστό χρωμοσωμικών ανωμαλιών στα σπερματοζωάρια ανδρών με φτωχές παραμέτρους σπέρματος, οι πρώτες μελέτες παιδιών που προήλθαν από ICSI είναι ενθαρρυντικές. Η ενημέρωση των ασθενών και η μακροπρόθεσμη παρακολούθηση των περιστατικών είναι αναγκαία. Μελέτες από διαφορετικές ευρωπαϊκές χώρες έδειξαν ότι υπάρχει μια πτωτική τάση της ποιότητας του σπέρματος τα τελευταία 50 χρόνια. Παρ' ότι αρκετές από τις μελέτες αυτές είναι αμφιλεγόμενες, έχουν δημιουργήσει ανησυχία για το αναπαραγωγικό μας μέλλον. Επιπλέον, περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν κατηγορηθεί για τη μείωση της αναπαραγωγικής μας ικανότητας και τη γένεση νεοπλασιών.

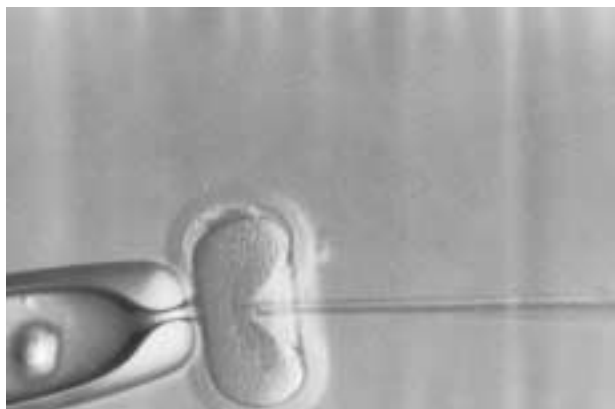
Λέξεις ευρητηριασμού: Ανδρική υπογονιμότητα, μέθοδοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, γονιμοποίηση με σπερματίδες, χρωμοσωμικές ανωμαλίες, πώση ποιότητας σπέρματος, IVF, ICSI.

Ανδρική στειρότητα

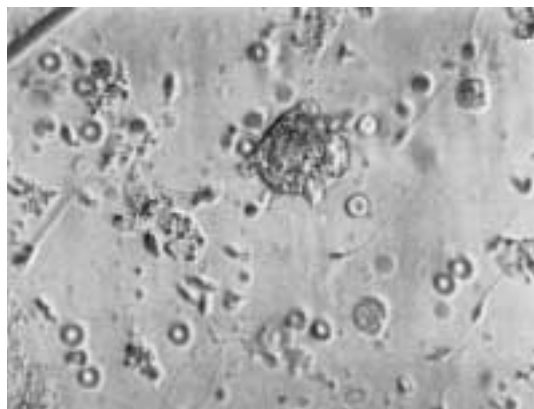
Έχουν περάσει δύο δεκαετίες από τη γέννηση του πρώτου παιδιού με τη μέθοδο της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Από τότε η υποβοηθούμενη αναπαραγωγή έχει αναπτυχθεί ταχύτατα και έχει δημιουργήσει κλάδους για την αντιμετώπιση των περισσότερων προβλημάτων στειρότητας.

Η οφειλόμενη στον ανδρικό παράγοντα υπογονιμότητα ήταν μέχρι πρόσφατα ένα από τα άλτα προβλήματα. Έγιναν διάφορες προσπάθειες με την ανάπτυξη τεχνικών για υποβοηθούμενη γονιμοποίηση στις περιπτώσεις που τα χαρακτηριστικά του σπέρματος ήταν τόσο φτωχά ώστε δεν μπορούσε να πραγματοποιηθεί η φυσιολογική¹. Η απλούστερη τεχνική ήταν η διάνοιξη της διαφανούς ζώνης (zona pellucida) του ωαρίου (με μηχανικά ή χημικά μέσα), ώστε να διευκολυνθεί η είσοδος των σπερματοζωαρίων (Partial Zona Dissection: PZD). Η τεχνική αυτή έχει μικρή μό-

Ινστιτούτο Γυναικολογίας & Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής.
Παρελήφθη 25.7.01.



Εικόνα 1. Μικρογονιμοποίηση ωαρίου.



Εικόνα 2. Επιλογή σπερματοζωαρίων από ορχική βιοψία.

νο επιτυχία, μια και συχνά επιτρέπει την είσοδο περισσότερών από ένα σπερματοζωαρίων. Μια πιο άμεση προσέγγιση ήταν η εισαγωγή στο περιλεκιθικό διάστημα (perivitelline space) μερικών κινητών σπερματοζωαρίων, μετά από συρρίκνωση του ωαρίου σε διάλυμα σουκρόζης (SUZI)². Τα ποσοστά επιτυχίας ήταν υψηλότερα από την PZD, αλλά και πάλι όχι αρκετά υψηλά, ώστε να αποτελούν κίνητρο για ένα ζευγάρι για να ξεκινήσει εξωσωματική γονιμοποίηση.

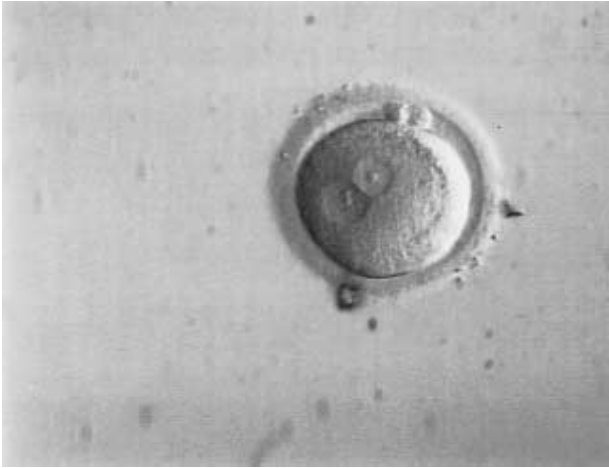
Η εισαγωγή της Μικροχειρουργικής Ωαρίου (Intracytoplasmic Sperm Injection: ICSI) το 1992 ήταν επαναστατική για την αντιμετώπιση της ανδρικής στειρότητας³ (Εικ. 1). Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει την εισαγωγή ενός σπερματοζωαρίου απευθείας στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου². Αδυναμία του σπερματοζωαρίου να διαπεράσει τη διαφανή ζώνη ή τη μεμβράνη του κυτταροπλάσματος (ωολήμμα), που πιθανόν να οφείλονταν σε ελαττωμένη κινητικότητα, μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης στη διαφανή ζώνη ή ανεπάρκεια ενζύμων για τη διάνοιξη της ζώνης, δεν αποτελούν πια εμπόδιο στη γονιμοποίηση (Εικ. 2). Η τεχνική αυτή είναι κατάλληλη για πολύ σοβαρές περιπτώσεις στειρότητας. Πριν από την εφαρμογή της ICSI οι πιθανότητες γονιμοποίησης ήταν ελάχιστες εάν δεν υπήρχαν το λιγότερο 500.000 σπερματοζωάρια με άριστη κινητικότητα (μετά την επεξεργασία). Σήμερα έχουν σημειωθεί εγκυμοσύνες ακόμα και σε περιπτώσεις που λίγα μόνο σπερματοζωάρια είχαν ανευρεθεί στο σπερματικό υγρό⁴.

Η τεχνική ICSI χρησιμοποιήθηκε σε ζευγάρια με επαναλαμβανόμενες αποτυχιές γονιμοποίησης in vitro ακόμα και όταν το σπέρμα είχε καλά χαρακτη-

στικά και, σύμφωνα με τα κριτήρια της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (World Health Organization), μπορούσε να χαρακτηριστεί φυσιολογικό⁵. Περιπτώσεις απόλυτης αποφρακτικής ή μη-αποφρακτικής αζωοσπερμίας, αντιμετωπίστηκαν με βιοψία σπερματοζωαρίων από ορχικό επιθήλιο (Testicular Sperm Extraction: TESE) ή επιδιδυμίδα (Micro Epididymal Sperm Aspiration: MESA), με υψηλά ποσοστά κύησης^{6,7}.

Υπάρχουν δύο πολύ σημαντικά στάδια για την επιτυχία της μικροχειρουργικής ωαρίου: 1) η ακινητοποίηση του σπερματοζωαρίου πριν από την έγχυσή του στο ωοκύτταρο και 2) η εισρόφηση ωοπλάσματος στην πιπέτα έγχυσης, πριν από την έγχυση του σπερματοζωαρίου. Με τη μηχανική ακινητοποίηση του σπερματοζωαρίου μειώνεται αφενός η κινητικότητά του, που θα μπορούσε να καταστρέψει τα κυτταρικά οργανίδια και αφετέρου επέρχεται η θραύση των κυτταρικών μεμβρανών του σπερματοζωαρίου η οποία πιθανόν εκκλύει παράγοντες που βοηθούν τη γονιμοποίηση. Μια άλλη υπόθεση είναι ότι η ύπαρξη της άθικτης μεμβράνης του σπερματοζωαρίου ενδέχεται να εμποδίζει παράγοντες που εκκρίνονται από το ωάριο να φτάσουν στον πυρήνα του σπερματοζωαρίου και να προξενίσουν την αποσυμπύκνωση (decondensation) της χρωματίνης του. Συνεπώς η ρήξη των μεμβρανών του σπερματοζωαρίου είναι απαραίτητη ώστε οι ωοπλασματικοί παράγοντες να δράσουν στον σπερματικό πυρήνα⁸.

Η εισρόφηση ωοπλάσματος στην πιπέτα έγχυσης είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη διαδικασία. Πολλές φορές, μετά την απόσυρση της μικροπιπέτας από το ωόπλα-



Εικόνα 3. Γονιμοποιημένο ωάριο, μια μέρα μετά τη μικρογονιμοποίηση με εμφανείς προπυρήνες.

σμα, και αφού έχει γίνει η έγχυση του σπερματοζωαρίου, παρατηρείται ότι στο ωάριο έχει μείνει ένα ανοιχτό κανάλι, το «αποτύπωμα» της εισόδου της πιπέτας. Αυτό που συμβαίνει είναι ότι έχει γίνει εγκόλπωση της μεμβράνης γύρω από την πιπέτα και το σπερματοζωάριο έχει εναποτεθεί στο περιλεκιθικό διάστημα αντί στο ωόπλασμα. Έτσι καταλήγουμε σε μια κατάσταση παρόμοια με τη SUZI και με τα αντίστοιχα ποσοστά γονιμοποίησης. Η εισρόφηση προξενεί ανάδευση του ωοπλάσματος, ώστε να εμποδίζεται μηχανικά το σπερματοζωάριο να βγει στο περιλεκιθικό διάστημα. Επίσης πιθανόν να δίνει το έναυσμα ώστε να ενεργοποιηθούν οι μηχανισμοί του ωαρίου για τη σύντηξη των προπυρήνων⁹.

Η ποσότητα του ωοπλάσματος που προσροφάται και επανεγχέεται στο ωάριο είναι πολύ σημαντική: υπάρχει ο κίνδυνος της πιθανής καταστροφής του ωαρίου. Ο σωστός σχεδιασμός χρήσης των μικροπιπετών (ειδικά η διάμετρος της πιπέτας έγχυσης) είναι πολύ σημαντικός ώστε ο χειρισμός να γίνεται κάτω από απόλυτο έλεγχο.

Η όλη διαδικασία είχε αρχικά δημιουργήσει ανησυχίες για πιθανότητες τραυματισμού του ωαρίου. Τα αποτελέσματα όμως δείχνουν ότι το ποσοστό των ωαρίων που καταστρέφονται από τη διαδικασία είναι μικρότερο από 10% σε έμπειρα χέρια¹⁰. Τα ποσοστά γονιμοποίησης κυμαίνονται γύρω στο 60%, χωρίς να επηρεάζει το εάν τα σπερματοζωάρια προήλθαν από βιοψία όρχεως, επιδιδυμίδας ή μετά από εκσπερμάτωση⁶. Σχεδόν όλα τα ζευγάρια (περίπου 90%) που

κάνουν εξωσωματική γονιμοποίηση με ICSI φτάνουν στο στάδιο της εμβρυομεταφοράς και τα ποσοστά εγκυμοσύνης είναι ισάξια ή και καλύτερα από αυτά της κλασικής εξωσωματικής γονιμοποίησης⁹.

Η επιτυχία της τεχνικής ICSI οδήγησε αρχικά πολλούς να προβλέψουν ότι στο μέλλον πιθανόν όλες οι περιπτώσεις εξωσωματικής γονιμοποίησης θα γίνονται με ICSI και όχι με απλή ενσπερμάτωση των ωαρίων¹¹.

Γονιμοποίηση με σπερματίδες

Μέχρι πρόσφατα, ασθενείς με μη-αποφρακτική αζωοσπερμία θεωρούνταν αδύνατον να θεραπευτούν. Σήμερα η Μικροχειρουργική Ωαρίου (ICSI) χρησιμοποιώντας σπερματίδες (Round Spermatid Nuclei Injection: ROSNI) δίνει κάποιες ελπίδες στους άνδρες αυτούς ώστε να αποκτήσουν ένα βιολογικά δικό τους παιδί¹². Οι πρώτες μελέτες για τη χρήση σπερματίδων έγιναν σε γαμέτες ποντικού, ινδικού χοιριδίου και κουνελιού. Οι απόπειρες γονιμοποίησης ήταν επιτυχημένες σ' αυτά τα πειραματόζωα και κατέληξαν στη γέννηση υγιών απογόνων¹³⁻¹⁵ (Εικ. 3).

Στον άνθρωπο έγινε επιτυχής γονιμοποίηση από σπερματίδα^{12,16} και σε σύντομο χρονικό διάστημα ανακοινώθηκαν και οι πρώτες εγκυμοσύνες^{11,17}. Μέχρι σήμερα έχουν ανακοινωθεί λιγότερες από 20 γεννήσεις υγιών παιδιών. Επιπλέον, μια κύηση έχει ήδη ανακοινωθεί με τη χρήση δευτερογενούς σπερματοκυττάρου¹⁸.

Η τεχνική ROSNI έχει προκαλέσει αντιδράσεις από επιστήμονες που θεωρούν ότι η εφαρμογή της είναι πρόωμη, μια και δεν υπάρχουν αρκετά ερευνητικά δεδομένα που να υποστηρίζουν την ασφαλή εφαρμογή της στον άνθρωπο. Οι περιορισμένες πληροφορίες από την εφαρμογή της ROSNI σε ωάρια τρωκτικών (τα οποία δεν είχαν πρόβλημα στειρότητας) κάνει την τεχνική ευάλωτη σε κριτικές. Οι πληροφορίες που έχουμε σχετικά με τις μετατροπές κατά την εξέλιξη της σπερματίδας σε σπερματοζωάριο είναι περιορισμένες. Έτσι δεν έχει διαλευκανθεί εάν οι μετατροπές αυτές είναι απαραίτητες για την εμβρυϊκή ανάπτυξη ή μόνο για τη μεταφορά των σπερματοζωαρίων και την εισαγωγή τους στο ωάριο^{19,20}.

Σήμερα βλέπουμε την ανάπτυξη μιας νέας τεχνικής όπου η καλλιέργεια στο εργαστήριο κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες έχει κατορθώσει να ξεκινήσει την παραπέρα ωρίμανση πρόωμων μορφών σπερμα-

τογένεσης σε ασθενείς οι οποίοι παρουσιάζουν καταστολή της διαδικασίας αυτής^{21,22}. Παρόλο που και η μέθοδος αυτή έχει αντιμετωπιστεί με επιφύλαξη, η πρώτη υγιής κύηση έχει ήδη επιτευχθεί²³.

Η χρησιμοποίηση σπερματίδων και άλλων άωρων μορφών σπερματογένεσης όπως και η *in vitro* καλλιέργεια ορχικού ιστού είναι ίσως οι μοναδικές ελπίδες ορισμένου αριθμού ανδρών να αποκτήσουν γενετικά δικό τους παιδί. Για πολλά ζευγάρια δε, αυτές οι μέθοδοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής είναι η μοναδική αποδεκτή λύση.

Γενετικές επιπτώσεις της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής

Παρά την επιτυχία του ICSI και των συναφών τεχνικών, υπάρχουν ερωτήματα που μένει να απαντηθούν. Πιστεύεται ότι η περίπλοκη διαδικασία της φυσιολογικής γονιμοποίησης δρα σαν φραγμός για τα σπερματοζώρια με τον ανώμαλο γενότυπο. Συνεπώς, όταν εισάγουμε μηχανικά ένα σπερματοζώριο μέσα στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου δρώντας με μόνο χαρακτηριστικό τη μορφολογία του, αυτοί οι επιλεκτικοί μηχανισμοί των σπερματοζωαρίων σταματούν να υπάρχουν²⁴.

Επιπλέον ερωτηματικά δημιουργούνται από κυτταρογενετικές μελέτες που δείχνουν υψηλά ποσοστά χρωμοσωμικών ανωμαλιών, και ειδικά ισοζυγισμένων μετατοπίσεων, σε υπογόνιμους άνδρες. Όσο ελαττώνονται οι δείκτες της ποιότητας του σπέρματος, τόσο αυξάνεται η πιθανότητα χρωμοσωματικής ανωμαλίας. Μήπως η προσπάθειά μας να βοηθήσουμε τους ασθενείς μας να αποκτήσουν ένα παιδί θα έχει σαν αποτέλεσμα αυτό το συγκεκριμένο παιδί να υποφέρει από μια συγγενή ανωμαλία; Μήπως θα ήταν λογικό να περιμένουμε υψηλά ποσοστά γενετικών ανωμαλιών σε απόγονους ασθενών που αδυνατούν να τεκνοποιήσουν φυσιολογικά; Μήπως υποβοηθούμε τη διαιώνιση ενός παθολογικού γενοτύπου όπου η στειρότητα είναι απλά η εκδήλωσή του²⁵;

Κατ' αρχήν ας εξετάσουμε τη θεωρία της διαφανούς ζώνης και της κυτταρικής μεμβράνης του ωαρίου: δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής στοιχεία που να υποστηρίζουν ότι αποτελούν φραγμό στη γονιμοποίηση από σπερματοζώρια με γενετικές ανωμαλίες. Το DNA του σπερματοζωαρίου είναι μεταγραφικά ανε-

νεργό, που θα ήταν δύσκολο να υποτεθεί ότι το ωάριο διαθέτει μηχανισμούς για την ανίχνευση της ύπαρξης μη-φυσιολογικού DNA. Εάν ένας τέτοιος μηχανισμός υπήρχε, τότε θα είχε παρατηρηθεί παραμορφωμένη αναλογία διαχωρισμού (segregation ratio distortion) στη μεταβίβαση γενετικών ασθενειών. Οι ελάχιστες περιπτώσεις παραμορφωμένης αναλογίας διαχωρισμού συνήθως οφείλονται σε μη μεντελικούς τρόπους κληρονομικότητας, όπως η μιτοχονδριακή. Οπότε για τις μονογονιδιακές ασθένειες, η επιλογή υπέρ του μη παθολογικού στο επίπεδο της γονιμοποίησης μπορεί να αποκλειστεί. Επίσης, σπερματοζώρια με ανευπλοειδίες είναι δυνατόν να γονιμοποιήσουν το ωάριο, γεγονός που πιστοποιείται από την ύπαρξη εμβρύων με ανευπλοειδία που προήλθαν από μη-διαχωρισμό στα χρωμοσώματα του πατέρα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το σύνδρομο Klinefelter, όπου το επιπλέον X χρωμόσωμα είναι πατρικής προέλευσης στο 50% των περιπτώσεων. Συνεπώς, δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα που να τεκμηριώνουν τη διαδικασία της επιλογής σπερματοζωαρίων στο επίπεδο της διαφανούς ζώνης.

Βάσιμα ερωτηματικά προκαλούνται από τη συσχέτιση ανδρικής υπογονιμότητας και χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Μια πρόσφατη μελέτη δείχνει ότι το ποσοστό των χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε άνδρες με κανονικές παραμέτρους σπέρματος ήταν 2,2%. Σε ασθενείς με ολιγοσπερμία 5,1%, με αζωοσπερμία 14,6% και με μη-αποφρακτική αζωοσπερμία 20,3%²⁶. Παρότι είναι γνωστό ότι η γονιμοποίηση από σπερματοζώρια με χρωμοσωμικές ανωμαλίες είναι δυνατή, δεν είναι γνωστό εάν το ποσοστό των ανώμαλων σπερματοζωαρίων που πετυχαίνουν γονιμοποίηση είναι το ίδιο ή μειωμένο σε σχέση με τα φυσιολογικά. Επίσης είναι άγνωστος ο αριθμός των ζυγωτών με ανευπλοειδισμό μη-συμβατό με τη ζωή, που αποβάλλονται στην αρχή της κύησης. Τα δεδομένα της Martin²⁷ δείχνουν ότι ένας μη-φυσιολογικός καρύτυπος (από ανάλυση περιφερικού αίματος) δεν συμβαδίζει πάντα με ανώμαλο γενότυπο των σπερματοζωαρίων: άντρες με γενετική σύσταση 47XYY παράγουν χρωμοσωμικά φυσιολογικά σπερματοζώρια. Το επιπλέον χρωμόσωμα φαίνεται ότι χάνεται κατά τη σπερματογένεση. Επίσης ο καρύτυπος από κύτταρα περιφερικού αίματος δεν είναι πάντα αντιπροσωπευτικός της γενοτυπικής κατάστασης του ατόμου

λόγω των περιπτώσεων μωσαϊκισμού που μένουν αδιάγνωστες²⁷. Η παιδιατρική παρακολούθηση παιδιών που γεννήθηκαν μετά από ICSI είναι πολύ ενθαρρυντική: τα ποσοστά των γενετικών ανωμαλιών των παιδιών αυτών είναι παρόμοια με των παιδιών που γεννιούνται μετά από IVF^{28,29}. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα κάθε νέας τεχνικής πρέπει να παρακολουθούνται μακροπρόθεσμα και να καταγράφονται σε βάση δεδομένων. Επίσης, είναι απαραίτητη η ενημέρωση των ασθενών σχετικά με την πρόσφατη ανακάλυψη και εφαρμογή της μεθόδου, τα στοιχεία που έχουν ήδη συγκεντρωθεί και την έλλειψη μακρόχρονης πείρας.

Προγεννητική διάγνωση για χρωμοσωμικές ανωμαλίες συνήθως προτείνεται εάν συντρέχουν διάφοροι παράγοντες, όπως η ηλικία της μητέρας, αλλά είναι αμφιλεγόμενο το εάν θα πρέπει να προταθεί με μόνη αιτιολογία την εφαρμογή ICSI. Οι υποψήφιοι ασθενείς για ICSI αποτελούν μια πολύ ετερογενή ομάδα, που περιλαμβάνει περιπτώσεις ολιγοσπερμίας που οφείλονται σε απόφραξη, μέχρι περιπτώσεις ισοζυγισμένων χρωμοσωμικών μετατοπίσεων, που έχουν σαν αποτέλεσμα εμβρυϊκές ανωμαλίες. Κάθε περίπτωση πρέπει να αντιμετωπίζεται ξεχωριστά και τα ζευγάρια να κατανοούν τις επιπτώσεις μιας γενετικής επιβάρυνσης, το μέγεθος του κινδύνου και τις δυνατότητες για πρόληψη.

Ακόμη και αν προσφέρουμε προγεννητική διάγνωση με ανάλυση καρυότυπου σε όλες τις γυναίκες που μένουν έγκυες μετά από IVF-ICSI, υπάρχει ένα ποσοστό μεταλλάξεων σημείου, που προκαλούν στειρότητα, και που θα έμενε αδιάγνωστο^{25,30} καθώς και ένα ποσοστό ασθενών με μωσαϊκισμό, όπου ο καρυότυπος από το αίμα δεν θα ερχόταν σε συμφωνία με τον καρυότυπο των γαμετών²⁷. Θα μπορούσε ίσως να προταθεί έλεγχος για τις σημειακές μεταλλάξεις και καρυότυπηση σπερματοζωαρίων. Μια τέτοια όμως στρατηγική θα αύξανε υπερβολικά το κόστος για τους ασθενείς, με αμφίβολη κλινική αξία. Σήμερα, με τις προόδους της μοριακής βιολογίας και γενετικής έχουμε τα εργαλεία να ερευνήσουμε και να διαλευκάνουμε τα διλήμματα που προκαλεί η εφαρμογή των νέων τεχνολογιών και να βοηθήσουμε τους ασθενείς (με τη σωστή πληροφόρηση) να πάρουν τη σωστή γι' αυτούς απόφαση.

Ήδη σήμερα είναι εφικτός ο διαχωρισμός των σπερματοζωαρίων με βάση την ποσότητα του DNA

που περιέχουν με τη μέθοδο της flow cytometric analysis^{31,32}; η μέθοδος αυτή έχει αρχίσει να εφαρμόζεται με επιτυχία για την επιλογή φύλου σε περιπτώσεις φυλοσύνδετης πάθησης³³. Στο μέλλον η ανάπτυξη αυτής της τεχνικής ίσως μπορέσει να ξεχωρίσει σπερματοζωάρια με φυσιολογική ή ανώμαλη χρωμοσωμική σύσταση.

Πτώση της ποιότητας του σπέρματος

Οι αυξανόμενες απαιτήσεις για τελειοποίηση των τεχνικών για την αντιμετώπιση της ανδρικής στειρότητας και τη διερεύνηση των αιτιών της, φαίνεται ότι δεν είναι τυχαίες. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η ποιότητα του σπέρματος φθίνει τις τελευταίες δεκαετίες³⁴⁻³⁷. Έρευνες που έδειχναν ότι η ποιότητα του σπέρματος χειροτερεύει με τον καιρό είχαν αντιμετωπιστεί με σκεπτικισμό, μια και οι περισσότερες βασίζονταν σε στοιχεία από επιλεγμένα άτομα (είτε με προβλήματα γονιμότητας, είτε από δότες σπέρματος)³⁸. Οι Carlsen et al³⁵ μελέτησαν την ποιότητα του σπέρματος στους Δανούς. Ξεκίνησαν τη μελέτη με άτομα που δεν εργαζόταν σε βιομηχανίες ή σε χώρους όπου υπήρχε έκθεση σε χημικές ουσίες (άτομα που φαίνονταν να είναι υγιή). Τα αποτελέσματα ήταν πρωτοφανή: το 84% των Δανών που εξετάστηκαν είχε σπέρμα που δεν πληρούσε τα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO)³⁵. Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία, υπολογίστηκε ότι υπήρχε πτώση του σπέρματος, από $113 \times 10^6/\text{ml}$ σε $66 \times 10^6/\text{ml}$, μεταξύ του 1950 και 1990^{34,35}. Επίσης κατά την ίδια περίοδο τριπλασιάστηκε ο αριθμός των ανδρών με αριθμό σπερματοζωαρίων λιγότερο από $20 \times 10^6/\text{ml}$. Τα αποτελέσματα των Carlsen et al³⁵ υποστηρίζει και η έρευνα των Auger et al³⁶ που μελέτησε 1.351 γόνιμους άνδρες στο Παρίσι. Στη μελέτη αυτή συμμετείχαν άντρες που είχαν ένα παιδί και ήταν, με μεγάλη πιθανότητα, γόνιμοι. Παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός σπερματοζωαρίων σ' αυτή την ομάδα είχε μειωθεί περίπου 2% ανά έτος για τα τελευταία 20 χρόνια. Το 1973 ο μέσος αριθμός σπερματοζωαρίων ήταν $89 \times 10^6/\text{ml}$, ενώ το 1992 ήταν 60 εκατομμύρια³⁶.

Η μελέτη αυτή δεν δείχνει μόνο την πτώση της ποσότητας των σπερματοζωαρίων, αλλά και της κινητικότητάς τους καθώς την αύξηση των ανώμαλων μορφών. Αυτές οι αλλαγές είναι ιδιαίτερα ανησυχητικές,

μια και η ποιότητα του ανθρώπινου σπέρματος είναι ήδη πολύ φτωχή, συγκρινόμενη με άλλων θηλαστικών. Περισσότερα από τα μισά από τα ανθρώπινα σπερματοζωάρια εμφανίζουν ανώμαλες μορφές, σε σύγκριση με το λιγότερο από το 5% σε άλλα είδη, και υπάρχει παράλληλη σχέση μεταξύ τερατοζωοσπερμίας και στειρότητας³⁹. Η απότομη μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων διαπιστώθηκε και στη Σκωτία. Άντρες που είχαν γεννηθεί τη δεκαετία του '50 είχαν μέσο αριθμό σπερματοζωαρίων $98 \times 10^6/\text{ml}$, ενώ εκείνοι που γεννήθηκαν τη δεκαετία του '60 είχαν μόνο $78 \times 10^6/\text{ml}$ ⁴⁰. Η σύγκριση των δύο ηλικιακών ομάδων δείχνει ότι ο ολικός αριθμός κινητών σπερματοζωαρίων ήταν 25% μικρότερος στους νεότερους άντρες. Αυτά τα στοιχεία επιβεβαιώνουν προηγούμενες έρευνες που έδειχναν πώση περίπου 2% το χρόνο^{36,40}.

Μια πρόσφατη έρευνα όμως που έγινε στην Αμερική δείχνει ότι δεν υπάρχει μείωση του σπέρματος, άλλα έντονες διαφορές από τη μια γεωγραφική περιοχή στην άλλη⁴¹. Το γεγονός ότι οι έρευνες κατέληξαν σε διαφορές στο σπέρμα από τη μια γεωγραφική περιοχή στην άλλη, πιθανόν υποδεικνύει ότι τα αποτελέσματα των μετρήσεων του σπέρματος αντανακλούν διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες μεταξύ αγροτικών και αστικών πληθυσμών^{38,42-43}.

Το πρόβλημα δεν είναι πλήρως τεκμηριωμένο. Υπάρχει γενική συναίνεση για μεγάλες προοπτικές έρευνας, όπου θα ακολουθούνται ταυτόσημες μέθοδοι μέτρησης και ανάλυσης. Η πώση της ποιότητας του σπέρματος δεν μπορεί να συσχετιστεί με την πώση των γεννήσεων στις χώρες του δυτικού κόσμου, μια και στο αποτέλεσμα συμβάλλουν πλήθος οικονομικών και κοινωνικών παραγόντων. Όταν όμως τα χαρακτηριστικά του σπέρματος κυμαίνονται σε «φυσιολογικά» επίπεδα, δεν αναμένεται να παρατηρηθεί πώση της γονιμότητας. Όμως η 2% το χρόνο υποβάθμιση της ποιότητας του σπέρματος σημαίνει ότι σε λίγες δεκαετίες ο μέσος όρος του σπέρματος θα βρίσκεται στην κλίμακα του υπογονίμου ή άγονου. Η συγκέντρωση στοιχείων για την παγκόσμια εικόνα της κατάστασης και η έρευνα για τις αιτίες που προκαλούν αυτή την υποβάθμιση, πρέπει να τύχουν απόλυτης προτεραιότητας.

Η πώση της ποιότητας του σπέρματος δεν είναι η μόνη ένδειξη των αναπαραγωγικών ανωμαλιών που

εμφανίζονται τα τελευταία χρόνια στον ανδρικό πληθυσμό. Μετά το 1940, το ποσοστό του καρκίνου των όρχεων έχει αυξηθεί 2-4 φορές στη Βόρεια Αμερική και Ευρώπη^{37,44-46}. Επίσης, το ποσοστό των νεογέννητων αγοριών με υποσπαδίες και κρυφορχία έχει αυξηθεί³⁹. Έχουν προταθεί διάφορες θεωρίες για να εξηγήσουν τη μείωση της ποιότητας του σπέρματος τα τελευταία χρόνια. Ήδη εδώ και χρόνια έχει προταθεί ότι τα οιστρογόνα παίζουν σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του όρχεος. Επιδημιολογικές έρευνες έχουν δείξει ότι η χορήγηση διμεθυλοστυλβηστρόλης (DES) κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ενώ δεν είχε δυσμενή επίδραση στις μητέρες, σχετίζεται άμεσα με αύξηση (στους γιους των γυναικών αυτών) των ποσοστών εμφάνισης καρκίνου των όρχεων και άλλων ανωμαλιών, όπως κρυφορχία και φτωχή ποιότητα σπέρματος, και στις κόρες τους με καρκίνο του κόλπου και κοιλιακή αδένωση⁴⁵. Πολλές βιομηχανικές τοξίνες έχουν παρόμοια χημική δομή με τα οιστρογόνα και μεγάλη συγγένεια με τους οιστρογονικούς υποδοχείς. Έτσι οι τοξίνες καταλαμβάνουν τους υποδοχείς των οιστρογόνων, μιμούμενες ατελώς ή ανωμάλως τη δράση τους και περιορίζοντας τη δράση των αληθινών ορμονών⁴⁶. Έτσι δρουν ως μιμητές οιστρογόνων. Αυτό είναι επικίνδυνο για το άρρεν έμβρυο, όταν η μητέρα του εκτίθεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Η παροπλισμένη δράση των φυσικών οιστρογόνων στον άνθρωπο μπορεί να προκαλέσει "θηλεοποίηση" του εμβρύου που έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση όλων αυτών των ανωμαλιών⁴⁷⁻⁴⁹. Η Εταιρεία για την Προστασία του Περιβάλλοντος της Δανίας δημοσίευσε πρόσφατα μια μελέτη για τη σχέση των χημικών προϊόντων στο περιβάλλον που μπορεί να έχουν οιστρογονική δράση και την αύξηση της συχνότητας της κρυφορχίας, καρκίνου των όρχεων και πώση του αριθμού των σπερματοζωαρίων⁵⁰.

Η έκθεση του εμβρύου σε περιβαλλοντικά οιστρογόνα ή μιμητές οιστρογόνων έχει επίσης κατηγορηθεί (μαζί με πολλούς περιβαλλοντικούς παράγοντες και τρόπο ζωής) για την αύξηση στη συχνότητα του καρκίνου του μαστού σε γυναίκες στις χώρες του δυτικού κόσμου τις τελευταίες δεκαετίες^{42,45}.

Φυσικά δεν είναι ο άνθρωπος ο μόνος δείκτης της υπονόμησης που συμβαίνει στη γονιμότητα. Ένας μεγάλος αριθμός από χημικά παράγωγα που εκκρίνονται στο περιβάλλον έχουν τη δυνατότητα να διαταρά-

ξουν το ενδοκρινολογικό σύστημα των οργανισμών. Τα χημικά αυτά παράγωγα περιλαμβάνουν εντομοκτόνα, φυτοφάρμακα, βιομηχανικά κατάλοιπα κ.ά. Πολλοί οργανισμοί έχουν επηρεαστεί από τις χημικές αυτές ουσίες. Σε πολλά ψάρια και πουλιά παρατηρούνται δυσλειτουργίες του θυρεοειδούς, μειωμένη γονιμότητα, μεταβολικές ανωμαλίες, απαρρενοποίηση των γεννητικών οργάνων κ.ά.⁵¹

Οι πληροφορίες που έχουμε σχετικά με τους περι-

βαλλοντικούς παράγοντες που είναι δυνητικά οιστρογονικοί είναι περιορισμένες. Πώς απορροφούνται και μεταβολίζονται; Έχουν αθροιστική δράση σε βιολογικά συστήματα; Έχουμε πολύ λίγες πληροφορίες για τη δοσολογία και τις συγκεντρώσεις που επιδρούν στον οργανισμό. Οι αλληλεπιδράσεις, η βιοσυσσώρευση και ο καταβολισμός των ουσιών αυτών πρέπει να ερευνηθούν, ειδικά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης που πιθανόν επηρεάζουν το έμβryo^{46,48}.

Summary

ELENI KONTOGIANNI

Male infertility and genetic consequences of assisted reproduction. *Hellenic Urology* 2001, 13: 322-330

IVS & Genetics

Male factor infertility, an unsolved problem for assisted reproduction in the past, can be treated today with the development of new techniques. The technique of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) has revolutionised the treatment of males with extremely poor semen parameters or previous unsuccessful fertilisation at IVF. Furthermore, ICSI in combination with surgical procedures to obtain spermatozoa such as Microepididymal Sperm Aspiration (MESA) or Testicular Sperm Extraction (TESE) has helped in cases of obstructive azoospermia. Spermatids and secondary spermatocytes have been used in a small scale to treat men with non-obstructive azoospermia. Despite the increased incidence of chromosomal abnormalities in patients with severe male factor infertility, the first large-scale studies of ICSI children are encouraging. Informed consent of future patients and long term studies are strictly necessary. Studies from different European countries have shown that there is a trend towards falling sperm counts over the past 50 years. Although controversial, the issue has generated concern over our reproductive fate. In addition, environmental factors have been implicated not only in the reduction of our reproductive capacity but also in the generation of malignancies.

Key words: Male infertility, assisted conception technologies, spermatid injection, chromosome abnormalities, falling sperm counts, IVF, ICSI.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. BAKER HWG, LIU DY, BOURNE H, LOPATA A. Diagnosis of sperm defects in selecting patients for assisted fertilization. *Hum Reprod* 1993, 8: 1779-1780.
2. VAN STEIRTEGHEM AC, LIU J, JORIS H, NAGY Z, JANSSENSWILLEN C, et al. Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum Reprod* 1993, 8: 1055-1060.
3. PALERMO G, JORIS H, DEVROEY P, VAN STEIRTEGHEM AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992, 340: 17-18.
4. MANSOUR RT, ABOULGHAR MA, SEROUR GI, AMIN YM, RAMZI AM. The effect of sperm parameters on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1995, 64: 982-986.
5. SHERINS RJ, THORSELL LP, DORFMANN A, DENNISON-LAGOS L, CALVO LP, et al. Intracytoplasmic

- sperm injection facilitates fertilization even in the most severe forms of male infertility: pregnancy outcome correlates with maternal age and number of eggs available. *Fertil Steril* 1995, 64: 369-375.
6. SILBER S, NAGY ZP, LIU J, GODOY H, DEVROEY P, VAN STEIRTEGHEM AC. Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum Reprod* 1994, 9: 1705-1709.
 7. PATRIZIO P, ORD T, BALMACEDA JP, ASCH RH. Use of epididymal sperm for assisted reproduction in men with acquired, irreparable obstructive azoospermia. *Reprod Fertil Dev* 1995, 7: 841-845.
 8. VAN BLERKOM J, DAVIS PW, MERRIAM J. A retrospective analysis of unfertilized and presumed parthenogenetically activated human oocytes demonstrates a high frequency of sperm penetration. *Hum Reprod* 1994, 9: 2381-2388.
 9. VAN STEIRTEGHEM A, NAGY Z, LIU J, JORIS H, VERHEYEN G et al. Intracytoplasmic sperm injection. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1994, 8: 85-93.
 10. VAN STEIRTEGHEM AC, NAGY Z, JORIS H, LIU J, STAESSEN C, et al. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993, 8: 1061-1066.
 11. FISHEL S, GREEN S, BISHOP M, THORNTON S, HUNTER A, et al. Injection of spermatid [letter]. *Lancet* 1995, 345: 1641-1642.
 12. SOFIKITIS NV, MIYAGAWA I, AGAPITOS E, PASYIANOS P, TODA T, et al. Reproductive capacity of the nucleus of the male gamete after completion of meiosis. *J Assist Reprod Genet* 1994, 11: 335-341.
 13. KIMURA Y, YANAGIMACHI R. Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. *Development* 1995, 121: 2397-2405.
 14. OGURA A, MATSUDA J, YANAGIMACHI R. Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1994, 91: 7460-7462.
 15. OGURA A, YANAGIMACHI R. Round spermatid nuclei injected into hamster oocytes form pronuclei and participate in syngamy. *Biol Reprod* 1993, 48: 219-225.
 16. VANDERZ WALMEN P, LEJEUNE B, NIJS M, SEGALBERTIN G, VANDAMME B, SCHOYSMAN R. Fertilization of an oocyte microinseminated with a spermatid in an in vitro fertilization programme. *Hum Reprod* 1995, 10: 502-503.
 17. TESARIK J, MENDOZA C, TESTART J. Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes [letter]. *N Engl J Med* 1995, 333: 525.
 18. SOFIKITIS NV, MANTZAVINOS T, LOUTRADIS D, YAMAMOTO Y, TARLATZIS V, MIYAGAWA I. Ooplasmic injections of secondary spermatocytes for non-obstructive azoospermia. *Lancet* 1998, 351: 1177-1178.
 19. BUTLER D. Spermatid injection fertilizes ethics debate [news]. *Nature* 1995, 377: 277.
 20. HINTON BT, PALLADINO MA, RUDOLPH D, LABUS JC. The epididymis as protector of maturing spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 1995, 7: 731-745.
 21. TESARIK J, GUIDO M, MENDOZA C, GRECO E. Human spermatogenesis in vitro: respective effects of follicle-stimulating hormone and testosterone on meiosis, spermiogenesis and Sertoli cell apoptosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83: 4467-4483.
 22. TESARIK J, BALABAN B, ISIKLAR A, ALATAS C, URMAN B, et al. In vitro spermatogenesis resumption in men with maturation arrest: relationship with in vivo blocking stage and serum FSH. *Hum Reprod* 2000, 15: 1350-1353.
 23. TESARIK J, BAHCECI M, OZCAN C, GRECO E, MENDOZA C. Restoration of fertility by in vitro spermatogenesis. *Lancet* 1999, 353: 555-556.
 24. COULAM CB, OPSAHL MS, SHERINS RJ, THORSELL LP, DORFMANN A, et al. Comparisons of pregnancy loss patterns after intracytoplasmic sperm injection and other assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 1996, 65: 1157-1162.
 25. VOGT PH, EDELMANN A, HIRSCHMAN P, KOHLER MR. The azoospermia factor (AZF) of the human Y chromosome in Yq11 - function and analysis in spermatogenesis. *Reprod Fertil Dev* 1995, 7: 685-693.
 26. YOSHIDA A, MIURA K, SHIRAI M. Cytogenetic survey of 1007 infertile males. *Urol Int* 1996, 58: 166-176.
 27. MARTIN R. The risk of chromosomal abnormalities following ICSI. *Hum Reprod* 1996, 11: 924-925.
 28. BONDUELLE M, CAMUS M, DE VOS A, STAESSEN C, TOURNAYE H, et al. Seven years of intracytoplasmic sperm injection and follow-up of 1987 subsequent children. *Hum Reprod* 1999, 14: 243-264.
 29. WENNERHOLM UB, BERGH C, HAMBERGER L, LUNDIN K, NILSSON L, et al. Incidence of congenital malformations in children born after ICSI. *Hum Reprod* 2000, 15: 944-948.
 30. WYROBEK A, LOWE X, PINKEL D, BISHOP J. Aneuploidy in late-step spermatids of mice detected by two-chromosome fluorescence in situ hybridization. *Mol Reprod Dev* 1995, 40: 259-266.
 31. JOHNSON LA, WELCH GR, KEYVANFAR K, DORFMANN A, FUGGER EF, SCHULMAN JD. Gender preselection in humans? Flow cytometric separation of X and Y spermatozoa for the prevention of X-linked diseases. *Hum Reprod* 1993, 8: 1733-1739.
 32. JOHNSON LA, SCHULMAN JD. The safety of sperm selection by flow cytometry. *Hum Reprod* 1994, 9: 758-759.

33. LEVINSON G, KEYVANFAR K, WU JC, FUGGER EF, FIELDS RA. DNA-based X-enriched sperm separation as an adjunct to preimplantation genetic testing for the prevention of x-linked disease. *Hum Reprod* 1995, 10: 979-982.
34. CARLSEN E, GIWERCMAN A, SKAKKEBAEK NE, KEIDING N. Decreasing quality of semen. *BMJ* 1993, 306: 461.
35. CARLSEN E, GIWERCMAN A, KEIDING N, SKAKKEBAEK NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 1992, 305: 609-613.
36. AUGER J, KUNSTMANN JM, CZYGLIK F, JOUANNET P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *New Engl J Med* 1995, 332: 281-285.
37. ADAMOPOULOS DA, PAPPA A, NICOPOULOU S, ANDREOU E, KARAMERTZANIS M, et al. Seminal volume and total sperm number trends in men attending subfertility clinics in the Greater Athens area. *Hum Reprod* 1996, 11: 1936-1941.
38. BROMWICH P, COHEN J, STEART I, WALKER A. Decline in sperm counts: an artefact of changed reference range of "normal"? *BMJ* 1994, 309: 19-22.
39. KEIDING N, GIWERCMAN A, CARLSEN E, SKAKKEBAEK NE. Falling sperm quality. *BMJ* 1994, 309: 131.
40. IRVINE S, CAWOOD E, RICHARDSON D, MacDONALD E, AITKEN J. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *BMJ* 1996, 312: 467-470.
41. FISCH H, GOLUBOFF ET. Geographic variations in sperm counts: a potential cause of bias in studies of semen quality. *Fertil Steril* 1996, 65: 1044-1046.
42. SHARPE RM, SKAKKEBAEK NE. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 1993, 341: 1392-1395.
43. BUJAN L, MANSART A, PONTEONNIER F, MIEUSSET R. Time series analysis of sperm concentration in fertile men in Toulouse, France, between 1977 and 1992. *BMJ* 1996, 312: 471-472.
44. ADAMI HO, BERGSTROM R, MOHNER M, ZATONSKI W, STORM H, et al. Testicular cancer in nine Northern European countries. *Int J Cancer* 1994, 59: 33-38.
45. HENDERSON BE, ROSS R, BERNSTEIN L. Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal foundation award lecture. *Cancer Res* 1988, 48: 246-253.
46. KELCE WR, STONE CR, LAWS SC, CRAY LE, KEMPAINEN JA, WILSON EM. Persistent DDT metabolite p,p'DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* 1995, 375:581-585.
47. ORTH JM, GUNSALUS GM, LAMPERTI AA. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid numbers in adults depend on number of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 1988, 122: 787-794.
48. STILLMAN RJ. In vitro exposure to diethylstilboestrol: adverse effects on the reproductive tract and reproductive performance in male and female offspring. *Am J Obstet Gynecol* 1982, 142: 905-921.
49. SHARPE RM. Another DDT connection. *Nature* 1995, 375: 538-539.
50. MINISTRY OF ENVIRONMENT AND ENERGY, DENMARK. Male reproductive health and environmental chemicals with estrogenic effects. Copenhagen: Danish Environmental Protection Agency, 1995. (Miljøprojekt No 290).
51. COLBORN T, VOM SAAL FS, SOTO AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 1993, 101: 378-384.