



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ  
ΟΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**«Σύγκριση αποτελεσμάτων διαγνωστικής βιοψίας όρχεως και  
θεραπευτικής βιοψίας όρχεως»**

**ΑΡΗΣ ΚΑΛΤΣΑΣ  
ΙΑΤΡΟΣ  
ΟΥΡΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020**









**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ  
ΟΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**«Σύγκριση αποτελεσμάτων διαγνωστικής βιοψίας όρχεως και  
θεραπευτικής βιοψίας όρχεως»**

**ΑΡΗΣ ΚΑΛΤΣΑΣ  
ΙΑΤΡΟΣ  
ΟΥΡΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020**



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»





Ημερομηνία αίτησης του κ. Καλτσά Άρη: 17-6-2016

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 791<sup>α</sup>/1-11-2016

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Σοφικίτης Νικόλαος, Καθηγητής Ουρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Γιαννάκης Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ουρολογίας επί του Επιστημονικού Πεδίου της Φυσιοπαθολογίας του Ουροποιητικού Συστήματος και της Ενδοσκοπικής Ουρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γιαννακόπουλος Ξενοφών, Επίκουρος Καθηγητής Ουρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 29-11-2016

«Σύγκριση αποτελεσμάτων διαγνωστικής βιοψίας όρχεως και θεραπευτικής βιοψίας όρχεως»

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ** 933<sup>α</sup>/28-7-2020

<b>Γιαννάκης Δημήτριος</b>	Καθηγητής Ουρολογίας επί του Επιστημονικού Πεδίου της Φυσιοπαθολογίας του Ουροποιητικού Συστήματος και της Ενδοσκοπικής Ουρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος</b>	Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Παρασκευαΐδης Ευάγγελος</b>	Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Πασχόπουλος Μηνάς</b>	Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Σοφικίτης Νικόλαος</b>	Καθηγητής Ουρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Γιαννακόπουλος Ξενοφών</b>	τ. Αναπληρωτής Καθηγητής Ουρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Μπαλτογιάννης Δημήτριος</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Ουρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 6-8-2020

Ιωάννινα 15-9-2020

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Άννα Μπατιστάτου**

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

**ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ**



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

«Σα βγεις στον πηγαιμό για την Ιθάκη,  
να εύχεται να 'ναι μακρύς ο δρόμος,  
γεμάτος περιπέτειες, γεμάτος γνώσεις»

Κ.Π. Καβάφης

Το ταξίδι αυτής της ακαδημαϊκής ερευνητικής προσπάθειας ήταν μακρύ και δύσκολο όχι όμως μοναχικό καθώς δίπλα μου στάθηκαν πολλά άτομα. Το λιγότερο που μπορώ να κάνω για αυτούς είναι να τους αναφέρω και να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου.

Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων Καθηγητή Ουρολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και Πρόεδρο του Ανδρολογικού Τμήματος της Ευρωπαϊκής Ουρολογικής Εταιρίας (ESAU) κ. Νικόλαο Σοφικίτη. Τον ευχαριστώ πρώτα από όλα για την εμπιστοσύνη και την ευκαιρία που μου προσέφερε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα μελέτης και για την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια του. Ένας πραγματικός ακαδημαϊκός δάσκαλος που έχει την επιστημονική προσφορά τρόπο ζωής. Η καθοδήγηση του ήταν πολύτιμη και ουσιαστική σε όλες τις φάσεις εκπόνησης αυτής της διδακτορικής διατριβής.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ουρολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής κ. Δημήτριο Γιαννάκη για την πολύτιμη βοήθεια και ουσιαστική καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της έρευνας δίνοντας μου σημαντικές επιστημονικές, ερευνητικές και συγγραφικές συμβουλές.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον τ. Αναπληρωτή Καθηγητή Ουρολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής κ. Ξενοφών Γιαννακόπουλο για την ουσιαστική καθοδήγηση και την επιστημονική υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την ψυχολογική και πνευματική υποστήριξη σε αυτό το ταξίδι της ερευνητικής προσπάθειας.



## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>5</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>7</b>
<b>ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ.....</b>	<b>9</b>
<i>Ανατομία του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος.....</i>	<i>9</i>
Όρχεις .....	10
Επιδιδυμίδα.....	15
Σπερματικός πόρος.....	16
Σπερματοδόχος κύστη .....	17
Προστάτης αδένας.....	18
Βολβοουρηθραίοι αδένες.....	19
Πέος.....	19
Ουρήθρα .....	20
<i>Φυσιολογία του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος.....</i>	<i>21</i>
Άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-όρχεις .....	21
Υποθάλαμος.....	21
Υπόφυση.....	22
Όρχεις .....	24
Η γήρανση και ο άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-όρχεις .....	26
<i>Εμβρυολογία του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος.....</i>	<i>29</i>
Μορφογένεση όρχεων .....	30
Μορφογένεση γεννητικών οργάνων του άρρενος.....	30
Ανάπτυξη του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-όρχεις.....	32
<i>Ορχικό μικροπεριβάλλον.....</i>	<i>33</i>
Μικροαρχιτεκτονική όρχεως .....	33
Διάμεσος χώρος.....	35
Σπερματικά σωληνάκια .....	38
Γεννητικά κύτταρα .....	40
Περισωληναριακή δομή.....	41
Αιματοορχικός φραγμός .....	42
<i>Σπερματογένεση.....</i>	<i>45</i>
Πολλαπλασιαστική φάση.....	46
Μειωτική φάση .....	46
Σπερμιογένεση.....	49
Διαταραχές σπερματογένεσης .....	53

<i>Ανδρική υπογονιμότητα</i> .....	57
Ορισμός και ταξινόμηση .....	57
Επιδημιολογία .....	57
Αιτιολογία .....	57
Διαγνωστική προσέγγιση .....	60
<i>Αζωοσπερμία</i> .....	71
Αποφρακτική αζωοσπερμία .....	72
Μη αποφρακτική αζωοσπερμία .....	74
<i>Διαγνωστική βιοψία όρχεως</i> .....	77
Ενδείξεις διαγνωστικής βιοψίας όρχεως .....	77
<i>Θεραπευτική βιοψία όρχεως</i> .....	87
Ενδείξεις θεραπευτικής βιοψίας όρχεως .....	88
<i>Χειρουργικές τεχνικές λήψης σπερματοζωαρίων</i> .....	91
<b>ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	<b>101</b>
<b>B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>103</b>
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>105</b>
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>107</b>
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>123</b>
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>127</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>129</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>131</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>133</b>

## **A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**





## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η υπογονιμότητα είναι η αδυναμία επίτευξης εγκυμοσύνης ενός ζευγαριού μετά από απροστάτευτες σεξουαλικές επαφές σε διάστημα 12 μηνών (1, 2). Περίπου το 15% των ζευγαριών έχει προβλήματα γονιμότητας και αναζητά ιατρική βοήθεια. Στο γενικό πληθυσμό περίπου το 7% των ανδρών πάσχει από υπογονιμότητα (3). Έχει αποδειχθεί ότι ο ανδρικός παράγοντας εμπλέκεται αποκλειστικά ή σε συνδυασμό με το γυναικείο παράγοντα στο 20-50% των περιπτώσεων υπογονιμότητας (4). Η ανδρική υπογονιμότητα έχει αποδοθεί σε διάφορες αιτίες, όπως ο τρόπος ζωής, η έκθεση σε γοναδοτοξίνες, η ορμονική δυσλειτουργία, οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες, η κισσοκήλη, οι διαταραχές εκσπερμάτισης κλπ. Η αξιολόγηση της ανδρικής υπογονιμότητας είναι σημαντική για τον εντοπισμό της αιτίας και την παροχή θεραπείας, εάν αυτή είναι αντιμετωπίσιμη (5).

Μία από τις πιο σοβαρές μορφές υπογονιμότητας είναι η αζωοσπερμία η οποία εμφανίζεται στο 1% των ανδρών του γενικού πληθυσμού (6) και στο 10-15% των υπογόνιμων ανδρών (7, 8). Στην αζωοσπερμία παρατηρείται πλήρης απουσία σπερματοζωαρίων στο σπερματικό υγρό ακόμα και όταν πραγματοποιείται μικροσκοπική εξέταση του ιζήματος μετά από φυγοκέντρηση του δείγματος σπέρματος (9, 10). Η αζωοσπερμία διακρίνεται σε δύο κατηγορίες: την αποφρακτική (OA) και τη μη αποφρακτική (NOA) (11). Στην OA δεν εμφανίζονται σπερματοζωάρια στο εκσπερμάτισμα εξαιτίας απόφραξης σε ένα σημείο της αποχετευτικής οδού του σπέρματος (12). Στη NOA η απουσία σπερματοζωαρίων στο εκσπερμάτισμα οφείλεται στη μειωμένη παραγωγή των σπερματοζωαρίων στους όρχεις, η οποία σχετίζεται με την προοδευτική ορχική βλάβη (13).

Η εφαρμογή των ενδοωαριακών ενέσεων σπερματοζωαρίων (ICSI) το 1992 (14), αποτέλεσε μία από τις μεγαλύτερες επαναστάσεις στις τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Στην ICSI πραγματοποιείται γονιμοποίηση in-vitro με την άμεση εισαγωγή ενός μόνο σπερματοζωαρίου σε ένα ώριμο ωάριο (14). Με αυτή την τεχνική προσφέρεται η ικανότητα να παρακαμφθούν ακόμη και μερικές από τις πιο σοβαρές μορφές ανδρικής υπογονιμότητας. Σχετικά με την αζωοσπερμία εάν δεν ενδεικνυόταν αιτιολογική θεραπεία, μέχρι τότε οι μοναδικές θεραπευτικές επιλογές ήταν δύο, η υιοθεσία ή η δωρεά σπέρματος. Πλέον τα υπογόνιμα ζευγάρια είχαν τη δυνατότητα να αποκτήσουν βιολογικούς απογόνους μέσω των κύκλων ICSI, αφού για κάθε ωάριο απαιτούνταν ένα

σπερματοζώαριο. Η εφαρμογή των κύκλων ICSI έφερε ελπίδα και κύμα αισιοδοξίας σε άνδρες με σοβαρή υπογονιμότητα και τους έδωσε την ευκαιρία να γίνουν βιολογικοί πατέρες.

Η αξιολόγηση της ανδρικής υπογονιμότητας απαιτεί μια ενδελεχή προσέγγιση που περιλαμβάνει ένα πλήρες ιατρικό ιστορικό, φυσική εξέταση και βασικές εργαστηριακές εξετάσεις. Η ταυτόχρονη κλινική εκτίμηση της συντρόφου είναι απαραίτητη, δεδομένης της πολυπαραγοντικής αιτιολογίας της υπογονιμότητας, καθώς και της πιθανής ανάγκης για τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής για τη θεραπεία του ανδρικού παράγοντα. Στη συνέχεια μετά την αξιολόγηση των αρχικών ευρημάτων μπορεί να απαιτηθεί η ανάγκη για περαιτέρω ειδικές εξετάσεις σπέρματος και γενετικό, ορμονικό ή απεικονιστικό έλεγχο, ώστε να καταλήξουμε στη σωστή διάγνωση και θεραπεία (15).

Η διαγνωστική βιοψία των όρχεων (DTB) παλαιότερα υπήρξε ο ακρογωνιαίος λίθος της διάγνωσης της υπογονιμότητας ανδρών με ανεξήγητη υπογονιμότητα και αζωοσπερμία. Οι πρόσφατες οδηγίες για την ανδρική υπογονιμότητα έχουν περιορίσει τις ενδείξεις για DTB στην επιβεβαίωση της OA σε άνδρες με φυσιολογικό μέγεθος και σύσταση όρχεων και φυσιολογικό ορμονικό προφίλ. Επίσης, η DTB πραγματοποιείται σε άνδρες με παράγοντες κινδύνου για κακοήθεια των όρχεων με σκοπό τον αποκλεισμό ύπαρξης νεοπλασίας (16).

Η ICSI και άλλες τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής απαιτούν σπερματοζώαρια η λήψη των οποίων γίνεται από τους όρχεις των ασθενών με αζωοσπερμία για τη γονιμοποίηση των ωαρίων της συντρόφου. Η λήψη των σπερματοζωαρίων πραγματοποιείται με τη θεραπευτική βιοψία όρχεως (TTB). Σήμερα η DTB και η TTB εκτελούνται στον ίδιο χειρουργικό χρόνο. Στην DTB ένα τμήμα ορχικού ιστού αποστέλλεται για ιστοπαθολογική εξέταση με σκοπό τον προσδιορισμό της σπερματογενετικής βλάβης και τον αποκλεισμό νεοπλασίας των όρχεων. Ο κύριος ρόλος της TTB είναι η λήψη σπερματοζωαρίων σε άνδρες με αζωοσπερμία με σκοπό να χρησιμοποιηθούν σε τεχνικές ICSI (17).

Η βιβλιογραφική ανασκόπηση της ανατομίας, της φυσιολογίας και της εμβρυολογίας του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος, της σπερματογένεσης, της παθοφυσιολογίας της ανδρικής υπογονιμότητας, της αζωοσπερμίας, της DTB και της TTB στοχεύουν στην συγκεφαλαίωση και στην αποδελτίωση τους, ώστε τα συμπεράσματα που θα εξαχθούν να ενισχύσουν την παρούσα ακαδημαϊκή ερευνητική προσπάθεια.

## ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

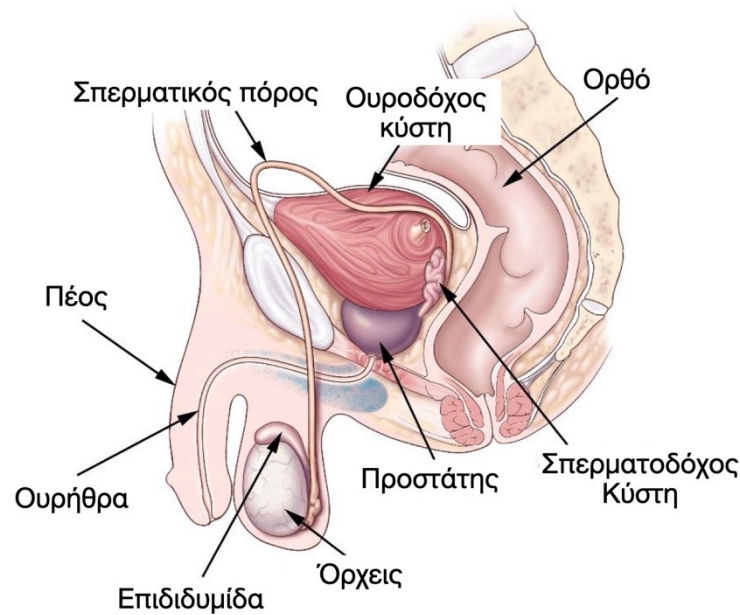
### Ανατομία του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος

Το αναπαραγωγικό σύστημα του άρρενος αποτελείται από ένα σύνολο οργάνων με κύριο σκοπό την παραγωγή ανδρικών γαμετών και τη μεταφορά τους στη γυναικεία αναπαραγωγική οδό. Το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα είναι δυνατό να διαιρεθεί σε τέσσερα κύρια λειτουργικά τμήματα (18):

- 1) Τους όρχεις, ένα ζεύγος οργάνων που βρίσκονται στο όσχεο και είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή των σπερματοζωαρίων και των γεννητικών ορμονών, των ανδρογόνων.
- 2) Την εκφορητική οδό, ένα ζεύγος γεννητικών πόρων που αποτελείται από την επιδιδυμίδα, το σπερματικό πόρο και τον εκσπερματιστικό πόρο. Συλλέγουν, αποθηκεύουν και μεταφέρουν τα σπερματοζωάρια από κάθε όρχι. Οι εκσπερματιστικοί πόροι εκβάλλουν στην ουρήθρα, μέσω της οποίας τα σπερματοζωάρια μεταφέρονται προς το γεννητικό σύστημα του θήλεος κατά τη διάρκεια της συνουσίας.
- 3) Τους επικουρικούς αδένες, τις σπερματοδόχες κύστεις, τον προστάτη αδένα, τους βολβοουρηθραίους αδένες του Cowper και τους ουρηθραίους αδένες του Littre, οι οποίοι παράγουν εκκρίσεις (σπερματικό υγρό) και μαζί με τα σπερματοζωάρια αποτελούν το σπέρμα.
- 4) Το πέος που είναι το όργανο της συνουσίας.

Το αναπαραγωγικό σύστημα του άρρενος έχει ως σκοπό (19):

- A) Την παραγωγή, την τροφική υποστήριξη, την ωρίμανση και την προσωρινή αποθήκευση των σπερματοζωαρίων
- B) Την εναπόθεση σπέρματος στο γεννητικό σύστημα του θήλεος μέσω της σεξουαλικής επαφής
- Γ) Την παραγωγή και έκκριση των ανδρικών γεννητικών ορμονών (ανδρογόνα)



**Εικόνα 1.** Το ανδρικό γεννητικό σύστημα  
[Τροποποιημένη αναφορά από <https://my.clevelandclinic.org>] (20).

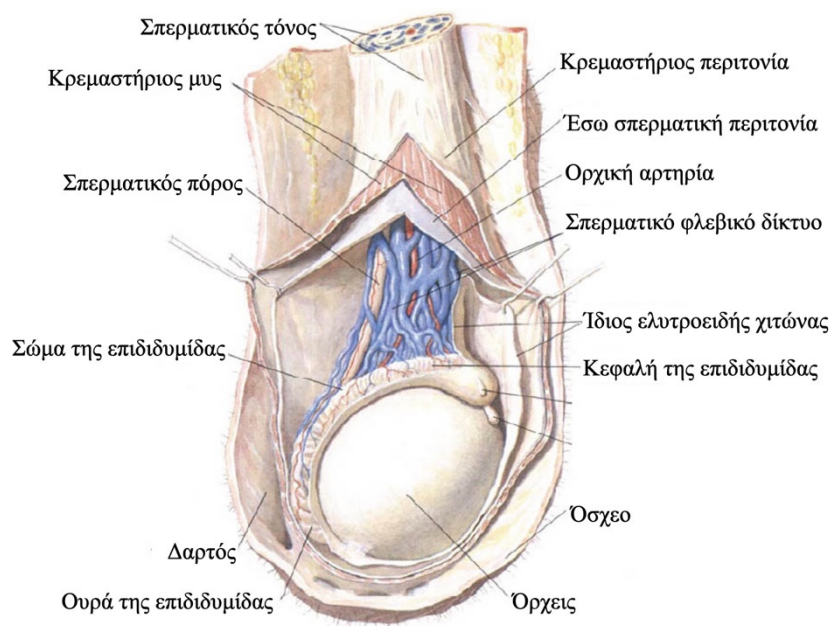
### Όρχεις

Οι όρχεις είναι οι γονάδες του άρρενος, ένα ζεύγος οργάνων με ελλειπτικό σχήμα που είναι υπεύθυνες για την παραγωγή σπερματοζωαρίων και ανδρικών γεννητικών ορμονών. Βρίσκονται έξω από την κοιλιακή χώρα και περιβάλλονται από ένα σάκο που παρέχει προστασία, το όσχεο. Κάθε όρχις έχει μήκος 4-5 cm, διάμετρο 2,5 cm και βάρος μεταξύ 14 και 18 g (21, 22). Εμφανίζει δύο πόλους, τον άνω πόλο στον οποίο επικάθεται η κεφαλή της επιδιδυμίδας και τον κάτω πόλο ο οποίος μέσω του οσχείκου συνδέσμου (οίακα) συμφύεται με τον πυθμένα του οσχέου (23).

Οι όρχεις αναπτύσσονται οπισθοπεριτοναϊκά και κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης μεταναστεύουν και κρέμονται στο όσχεο στα άκρα των σπερματικών τόνων. Περιβάλλονται από διάφορους χιτώνες, οι οποίοι είναι προσεκβολές των αντίστοιχων στιβάδων του πρόσθιου κοιλιακού τοιχώματος. Το περίβλημα δέρματος που περιβάλλει τους όρχεις ονομάζεται όσχεο. Μέσα από το δέρμα του οσχέου στενά συνδεδεμένος βρίσκεται ο δαρτός, ένα λεπτό ινομυώδες πέταλο. Μέσα από το δαρτό βρίσκεται η έξω σπερματική περιτονία, ως συνέχεια της απονεύρωσης του έξω κοιλιακού μυός. Μέσα από την έξω σπερματική περιτονία βρίσκεται ο κρεμαστήριος μυς και η κρεμαστήριος περιτονία, το καθένα από τα οποία αντιστοιχεί στον έσω λοξό και τον εγκάρσιο κοιλιακό μυ. Μέσα από την κρεμαστήριο περιτονία βρίσκεται η έσω σπερματική περιτονία (κοινός

ελυτροειδής χιτώνας). Η εγκάρσια περιτονία, από την οποία προέρχεται ο κοινός ελυτροειδής χιτώνας, καταδύεται εντός του κοιλιακού στόμιου του βουβωνικού πόρου και περιβάλλει τον όρχι μαζί με την επιδιδυμίδα.

Μέσα από τον κοινό ελυτροειδή χιτώνα βρίσκεται ο ίδιος ελυτροειδής χιτώνας, ο οποίος προέρχεται από το περιτόναιο και είναι ο ορογόνος χιτώνας του όρχεως. Αποτελείται από δύο πέταλα, το περίτονο που συνέχεται με τον κοινό ελυτροειδή χιτώνα και το περισπλάχνιο που περιβάλλει τον όρχι και την επιδιδυμίδα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, μεταξύ των δύο αυτών πετάλων υπάρχει ελάχιστη ποσότητα υγρού που επιτρέπει την ελεύθερη κίνηση των όρχεων εντός του οσχέου. Το όσχεο όχι μόνο υποστηρίζει τους όρχεις αλλά επίσης, με χάλαση ή συστολή του μυϊκού στρώματος βοηθά στη ρύθμιση της θερμοκρασίας τους (24, 25).



**Εικόνα 2.** Περιβλήματα του όρχεως.

Ο όρχις είναι ένα όργανο με πλούσια αιμάτωση. Υπάρχουν τρεις διαφορετικές αρτηρίες που τροφοδοτούν με αίμα τον όρχι: η ορχική (έσω σπερματική) αρτηρία, η αρτηρία του σπερματικού πόρου και η κρεμαστήρια (έξω σπερματική) αρτηρία. Κύριο ρόλο στην αιμάτωση του όρχι έχει η ορχική αρτηρία. Η ορχική αρτηρία, η οποία προέρχεται από την κοιλιακή αορτή, πορεύεται στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο για να εισέλθει στο έσω βουβωνικό στόμιο και να συμπορευθεί με τον σπερματικό τόνο (26).

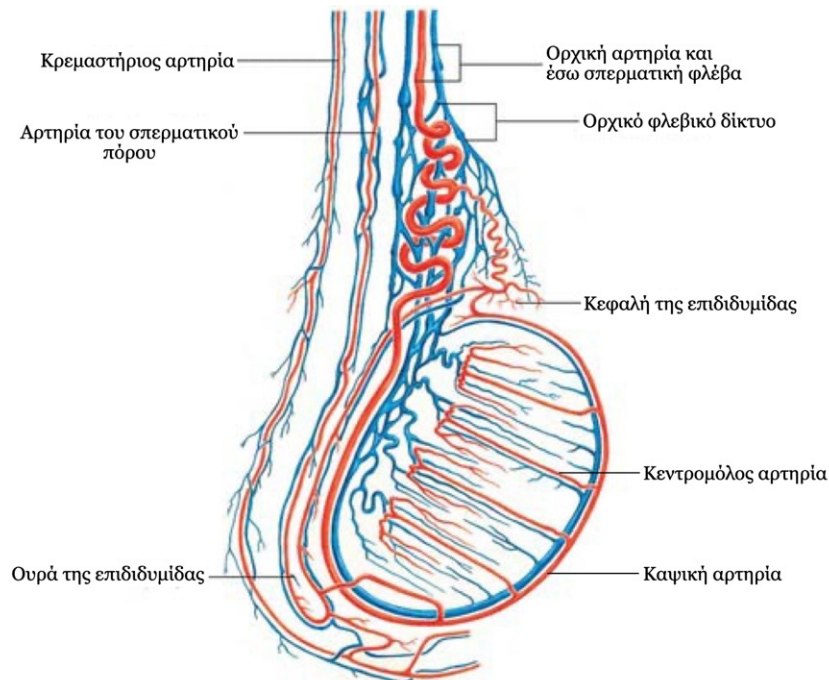
Καθώς η ορχική αρτηρία πορεύεται προς τους όρχεις διακλαδίζεται σε μια εσωτερική αρτηρία και διανέμεται στο μεγαλύτερο μέρος του όρχεως, σε μια κατώτερη ορχική αρτηρία που αιματώνει τον κάτω πόλο του όρχεως και σε ένα κεφαλικό αρτηριακό κλάδο που αιματώνει την κεφαλή της επιδιδυμίδας. Μπορεί να υπάρχει παραλλαγή στο επίπεδο αυτής της διακλάδωσης, η οποία έχει βρεθεί ότι απαντάται μέσα στο βουβωνικό κανάλι στο 31% έως 88% των περιπτώσεων (27). Στο 56% των περιπτώσεων μια μόνο αρτηρία εισέρχεται στους όρχεις. Στο 31% των περιπτώσεων, υπάρχουν δύο κλάδοι και στο 13% υπάρχουν τρεις ή περισσότεροι κλάδοι αυτής της αρτηρίας (28).

Οι αρτηριακές αναστομώσεις στην κεφαλή της επιδιδυμίδας επιτρέπουν την πλούσια παροχή αίματος μεταξύ της ορχικής αρτηρίας και της κεφαλικής αρτηρίας. Στην ουρά της επιδιδυμίδας σχηματίζονται αρτηριακές αναστομώσεις μεταξύ της ορχικής, της επιδιδυμικής, της κρεμαστήριας και της εκφορητικής αρτηρίας. Η εκφορητική αρτηρία ή αρτηρία του σπερματικού πόρου προέρχεται από την έσω λαγόνια αρτηρία ή από την άνω κυστική αρτηρία. Η κρεμαστήρια ή έξω σπερματική αρτηρία προέρχεται από την κάτω επιγαστρία αρτηρία και προμηθεύει κυρίως τον ιδίως ελυτροειδή, αλλά έχει και κλάδους που πηγαίνουν στους όρχεις (28).

Κλάδοι της ορχικής αρτηρίας διακλαδίζονται στην αγγειακή περιτονία του όρχεως ως καμικές αρτηρίες σχηματίζοντας ένα ευρύ αγγειακό πλέγμα. Από αυτό το πλέγμα εκφύονται οι κεντρομόλες αρτηρίες, με σημαντικό ποσοστό να εμφανίζει ελικοειδή πορεία, οι οποίες πορεύονται προς το μεσαύλιο και στη συνέχεια αντιστρέφουν την πορεία του και επιστρέφουν ως φυγόκεντρες. Και οι δύο αυτές αρτηρίες διακλαδίζονται στο ορχικό παρέγχυμα και καταλήγουν ως μεσοσωληναριακά αρτηριόλια. Τα τριχοειδή που προκύπτουν από τα αρτηριόλια εισέρχονται στον διάμεσο χώρο, διατάσσονται παράλληλα προς τα σπερματικά σωληνάκια, διαμορφώνοντας έτσι έναν αιματοορχικό φραγμό στον οποίο συμβαίνουν φαινόμενα εκλεκτικής ανταλλαγής ουσιών (26).

Η κατανόηση της κατανομής των κεντρομόλων αρτηριών είναι σημαντική κατά τη διάρκεια της βιοψίας των όρχεων. Ένας μεγάλος αρτηριακός κλάδος πιθανότητα θα ανευρίσκεται κυρίως στο πρόσθιο τμήμα του άνω πόλου και στο πρόσθιο, μέσο και πλάγιο τμήμα του κάτω πόλου των όρχεων. Για αυτό, κατά τη διάρκεια επεμβάσεων στον όρχι, θα πρέπει να αποφεύγεται η τοποθέτηση ραμμάτων στον κάτω πόλο του όρχεως. Επίσης οι βιοψίες όρχεων θα πρέπει να πραγματοποιούνται στη μεσότητα ή στις πλάγιες επιφάνειες του άνω πόλου, ώστε να ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος τραυματισμού των αγγείων. Στην μεσότητα του όρχεως εντοπίζονται λιγότερα αγγεία σε σχέση με τον άνω και κάτω πόλο του όρχεως (26).

Η ύπαρξη αναστομωτικών κλάδων μεταξύ των αρτηριών που αιματώνουν τον όρχι, δίνει την δυνατότητα ακόμα και στην περίπτωση κάκωσης ή απολίνωσης της ορχικής αρτηρίας, να παρέχεται επαρκή παροχή αίματος στους όρχεις από την αρτηρία του σπερματικού πόρου και την κρεμαστήρια αρτηρία (28).



**Εικόνα 3.** Η αρτηριακή αιμάτωση και η φλεβική αποχέτευση του όρχεως.  
[Τροποποιημένη αναφορά](29).

Σε αντίθεση με τα περισσότερα άλλα φλεβικά δίκτυα στο ανθρώπινο σώμα, η φλεβική αποχέτευση εντός των όρχεων δεν συμβαδίζει με την αντίστοιχη αρτηριακή. Οι μικρές παρεγχυματικές φλέβες είτε αποχετεύονται σε μια ομάδα φλεβών κοντά στο μεσόρχιο είτε σε φλέβες στην επιφάνεια των όρχεων (28). Αυτές οι δύο ομάδες φλεβών αναστομώνονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν το ελικοειδές σπερματικό πλέγμα. Το ελικοειδές πλέγμα (rampiniform plexus) είναι ένα δίκτυο φλεβών έντονα αναστομούμενο που περιβάλλει την ορχική αρτηρία, αποτελώντας με αυτό τον τρόπο τη βάση του συστήματος, το οποίο επιτρέπει την ανταλλαγή θερμότητας που δρα επικουρικά στην διατήρηση της διαφοράς θερμοκρασίας μεταξύ του οσχείκου όρχι και της ενδοκοιλιακής χώρας (30).

Κατά την πορεία τους οι φλέβες των όρχεων αναστομώνονται και με στελέχη άλλων φλεβών όπως: 1) την κρεμαστήρια φλέβα η οποία εκβάλλει στην κάτω επιγάστριο και στην

έξω λαγόνια φλέβα, 2) τις οσχεϊκές φλέβες που εκβάλλουν στην έξω αιδοϊκή και στη μηριαία φλέβα και 3) τις φλέβες του σπερματικού πόρου που εκβάλλουν στην έσω λαγόνιο φλέβα. Το σπερματικό φλεβικό δίκτυο στο ύψος του έσω βουβωνικού δακτυλίου σχηματίζει τις έσω σπερματικές φλέβες. Η δεξιά έσω σπερματική φλέβα εκβάλλει στην κάτω κοίλη φλέβα ενώ η αριστερή καταλήγει απευθείας στην αριστερή νεφρική φλέβα (31).

Η ορχική αρτηρία προέρχεται από την κοιλιακή αορτή και συνδέεται στενά με το σπερματικό φλεβικό δίκτυο (ελικοειδές πλέγμα). Η διάταξη των αγγείων εντός του ελικοειδούς πλέγματος, με την παράλληλη διάταξη της ορχικής αρτηρίας και φλεβών οδηγεί στην δημιουργία αντιρρούματος. Η αντιρροή αυτή, διευκολύνει την ανταλλαγή θερμότητας και μικρών μορίων. Οι κλάδοι του φλεβικού πλέγματος έχουν λεπτό τοίχωμα και πιθανότατα συμβάλλουν στην παθητική διάχυση της τεστοστερόνης και της θερμότητας με την ορχική αρτηρία που είναι σε στενή επαφή. Για παράδειγμα, η τεστοστερόνη διαχέεται παθητικά από τις φλέβες στην αρτηρία λόγω διαφοράς συγκέντρωσης (32). Επίσης λόγω της αντιρροής, παρέχεται αρτηριακό αίμα στους όρχεις που είναι θερμοκρασίας 2°C έως 4°C χαμηλότερης από τη φυσιολογική θερμοκρασία του ορθού στους άνδρες (33). Η απώλεια της διαφοράς της θερμότητας σχετίζεται με δυσλειτουργία των όρχεων σε άνδρες με κισσοκήλη (34) και κρυσορχία (35).

Οι καυικές αρτηρίες έχουν τη δυνατότητα αυτορρύθμισης (36). Πεπτίδια όπως το κοιλιακό νατριουρητικό πεπτίδιο (ANP) που εκκρίνονται με βάση τις τοπικές μεταβολικές ανάγκες και η υποβοηθούμενη μεταφορά μορίων όπως η ωχρινοτρόπος ορμόνη (LH) διαμέσου του αγγειακού ενδοθηλίου ρυθμίζουν τον αγγειακό τόνο (37, 38). Πράγματι, αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν μια εξαιρετικά εξειδικευμένη λειτουργία για την μικροαγγείωση των όρχεων (39).

Ο όρχις δεν έχει γνωστή σωματική νεύρωση. Λαμβάνουν αυτόνομη νεύρωση κυρίως από το μεσομεσεντερικό και το νεφρικό πλέγμα (40). Αυτά τα νεύρα πορεύονται κατά μήκος της ορχικής αρτηρίας εντός του όρχεως. Φαίνεται ότι η ορχική αδρενεργική νεύρωση περιορίζεται κυρίως στα μικρά αιμοφόρα αγγεία που αιματώνουν αθροίσεις κυττάρων Leydig και ρυθμίζουν τη στεροειδογένεση των κυττάρων Leydig (41). Πιστεύεται, ότι ο αγγειακός τόνος στους όρχεις μπορεί να ρυθμίζεται σε διάφορα επίπεδα (42).

Μέσα στον σπερματικό τόνο πορεύονται λεμφαγγεία (43). Η απόφραξη αυτών των λεμφαγγείων οδηγεί σε διάταση του μεσορχίου αλλά όχι των σπερματικών σωληναρίων, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο διάμεσος χώρος αποχετεύεται από λεμφαγγεία, αλλά τα σπερματικά σωληνάκια όχι. Η λεμφική απόφραξη μπορεί επίσης να οδηγήσει στην



εμφάνιση υδροκήλης, μια γνωστή επιπλοκή της αποκατάστασης της κισσοκήλης και της βουβωνοκήλης. Το ενδοσωληναριακό υγρό που περιέχει σπερματοζωάρια μεταφέρεται από τα σπερματικά σωληνάρια στο ορχικό δίκτυο και εν συνεχεία στην κεφαλή της επιδιδυμίδας. Αυτό το υγρό που είναι ισοσμωτικό με το πλάσμα, πιστεύεται ότι προέρχεται κυρίως από τα σπερματικά σωληνάρια. Η επαναπορρόφηση αυτού του υγρού από το ορχικό δίκτυο και από τα απαγωγά σωληνάρια ρυθμίζεται από τα οιστρογόνα (44). Η σύνθεση του ενδοσωληναριακού υγρού διαφέρει σημαντικά από αυτή του πλάσματος και της λέμφου. Αυτό υποδηλώνει ότι οι ουσίες δεν μπορούν να διαχέονται ελεύθερα μέσα και έξω από τα σπερματικά σωληνάρια (45).

### Επιδιδυμίδα

Τα σπερματοζωάρια εισέρχονται στην επιδιδυμίδα μετά την παραγωγή τους από τους όρχεις. Η επιδιδυμίδα είναι ένας μακρύς περιελιγμένος σωλήνας μήκους 3 έως 4 μέτρων που εδράζεται στον άνω πόλο και στο οπίσθιο χείλος του όρχεως. Μεσολαβεί μεταξύ του όρχι και του σπερματικού πόρου και διακρίνεται σε τρία μέρη: την κεφαλή, το σώμα και την ουρά (46).

Οι κύριες λειτουργίες της επιδιδυμίδας είναι (47):

- 1) η μεταφορά των σπερματοζωαρίων,
- 2) η απορρόφηση του ορχικού υγρού
- 3) η φαγοκυττάρωση εκφυλισμένων σπερματοζωαρίων και υπολειμματικών σωματίων
- 4) η ωρίμανση των σπερματοζωαρίων κατά τη μεταφορά τους
- 5) η σταθεροποίηση της συμπυκνωμένης χρωματίνης
- 6) οι μεταβολές του φορτίου στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης και η πρόσληψη νέων επιφανειακών πρωτεϊνών
- 7) η έκκριση γλυκοπρωτεϊνών, L-καρνιτίνης, σιαλικού οξέος γλυκερυλφωσφορυλοχολίνης για την απόκτηση της προς τα πρόσω κίνησης
- 8) η αποθήκευση των σπερματοζωαρίων μέχρι την εκσπερμάτιση και
- 9) η προστασία τους.

Η διέλευση από την επιδιδυμίδα προκαλεί πολλές αλλαγές στο νεοσχηματισμένο σπερματοζωάριο, συμπεριλαμβανομένης της αύξησης της λειτουργικής κινητικότητας και μεταβολές στο επιφανειακό φορτίο, στις πρωτεΐνες μεμβράνης, στη ανοσοαντίδραση, στα φωσφολιπίδια, στην περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα και στη δραστηριότητα της αδενυλικής

κυκλάσης. Αυτές οι αλλαγές βελτιώνουν τη δομική ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης, αυξάνουν την ικανότητα γονιμοποίησης και βελτιώνουν την κινητικότητα του σπερματοζωαρίου. Τα σπερματοζωάρια στους όρχεις έχουν πολύ χαμηλή ή καθόλου προωθητική κινητικότητα. Αποκτούν προωθητική κίνηση και γίνονται λειτουργικά μόνο μετά τη διέλευση από την επιδιδυμίδα. Ο χρόνος διέλευσης των σπερματοζωαρίων από την επιδιδυμίδα θεωρείται ότι διαρκεί από 2 έως 12 ημέρες στον άνθρωπο (48).

Το μήκος της επιδιδυμίδας καθυστερεί την απελευθέρωση του ανώριμου σπερματοζωαρίου, παρέχοντάς του έναν κατάλληλο χρόνο για να ωριμάσει. Το ώριμο σπερματοζωάριο αποθηκεύεται κατά κύριο λόγο στην ουρά της επιδιδυμίδας μέχρι την εκσπερμάτιση. Ο χρόνος αποθήκευσης χωρίς αλλοίωση της γονιμοποιητικής ικανότητας εκτιμάται ότι δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 2 εβδομάδες (49), καθώς η παράταση του ενδεχομένως αποτελεί αιτία υπογονιμότητας (50). Η λειτουργία της επιδιδυμίδας εξαρτάται άμεσα από τη θερμοκρασία και από τα ανδρογόνα (κυρίως η διυδροτεστοστερόνη, DHT) (51).

### Σπερματικός πόρος

Ο σπερματικός πόρος είναι ένας κοίλος, ευθύς, μυϊκός σωλήνας μήκους 30-40 cm, ο οποίος ως ανατομική συνέχεια της ουράς της επιδιδυμίδας επεκτείνεται έως τον εκσπερματιστικό πόρο. Διακρίνεται σε 5 μοίρες ανάλογα με την θέση του: την ορχική, την τονική, την βουβωνική, την πυελική και την κυστική. Ο σπερματικός πόρος έχει λεπτό αυλό και παχύ τοίχωμα που αποτελείται από το βλεννογόνο, που φέρει επιθήλιο ψευδοπολύστιβο κυλινδρικό με στερεοκροσσούς, από το χόριο πλούσιο σε ελαστικές ίνες και από τον μυϊκό χιτώνα που διακρίνεται σε 3 μυϊκές στιβάδες (έσω επιμήκη, μέση κυκλοτερή, έξω επιμήκη) (52, 53).

Ο σπερματικός πόρος, εκτός από ένας αγωγός μεταφοράς σπερματοζωαρίων, αποτελεί και ένα μέσο ελέγχου και ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων. Εντός του αυλού γίνεται η ωρίμανση των σπερματοζωαρίων. Η λειτουργία των κυττάρων του βλεννογόνου του σπερματικού πόρου είναι κυρίως η φαγοκυττάρωση των σπερματοζωαρίων έχοντας μόνο μικρή εκκριτική λειτουργία. Η λειτουργία του επιθηλίου και ο τόνος των λείων μυϊκών ινών του σπερματικού πόρου ελέγχονται από τα ανδρογόνα. Η μείωση των ανδρογόνων προκαλεί διαταραχές της συσταλτικότητας των λείων μυϊκών ινών (54).

## Σπερματοδόχος κύστη

Οι σπερματοδόχες κύστες είναι δύο πολύχωροι σάκοι που βρίσκονται πάνω από τη βάση του προστάτη στην οπίσθια πλευρά της ουροδόχου κύστης. Κάθε σπερματοδόχος κύστη έχει μήκος 5 έως 7 cm και πλάτος έως 1,5 cm. Είναι περιελιγμένοι σχηματισμοί και αν αποσυσπειρωθούν μπορεί να έχουν μήκος έως 15 cm. Στην σπερματοδόχο κύστη διακρίνονται τρία στρώματα: ο βλεννογόνος, με πολυσύνθετες ψηλές στενές πτυχώσεις, ο υποβλεννογόνος, ο οποίος είναι πλούσιος σε κολλαγόνο καλυμμένο από λεπτό στρώμα μυϊκών ινών και η κάψα συνδετικού ιστού (52, 55).

Οι σπερματοδόχες κύστες παράγουν μια παχύρευστη λευκοκίτρινη έκκριση που αποτελεί περίπου το 80% του συνολικού όγκου της εκσπερμάτισης. Το έκκριμά τους είναι ένα υπεριζώδες, αλκαλικό υγρό πλούσιο σε φρουκτόζη, προσταγλανδίνες, ιόντα K<sup>+</sup>, πρωτεΐνες, αμινοξέα, ασκορβικό οξύ και κιτρικό οξύ. Στις σπερματοδόχες κύστες δεν αποθηκεύονται σπερματοζωάρια (54, 55).

Οι κύριες λειτουργίες του εκκρίματος των σπερματοδόχων κύστεων είναι (56):

- 1) Η συμβολή στην πήξη του σπέρματος (semenogelin-1)
- 2) Η ρύθμιση του ιζώδους του σπέρματος (σε ανεπαρκή λειτουργία των κύστεων αυξάνεται το ιζώδες)
- 3) Η προαγωγή της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων (K, Mg, διττανθρακικά, 19-OH-PG, PRL)
- 4) Η αντιοξειδωτική προστασία (ασκορβικό οξύ)
- 5) Η καταστολή της ανοσολογικής δραστηριότητας στη γυναικεία αναπαραγωγική οδό (IgG-FcRIII Ag, TLX, MHS-5) και,
- 6) Η σταθεροποίηση της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων (δεσμευτικές ουσίες Zn)

Λόγω της κοινής εμβρυικής τους προέλευσης, η αγενεσία των σπερματοδόχων κύστεων συσχετίζεται με συγγενή απλασία των σπερματικών πόρων. Στην αποφρακτική αζωοσπερμία που οφείλεται σε απουσία του σπερματικού πόρου χαρακτηριστικό εργαστηριακό εύρημα είναι η απουσία φρουκτόζης. Αντίθετα, στην μη αποφρακτική αζωοσπερμία, λόγω διαταραχής στη σπερματογένεση, ή αν η απόφραξη εντοπίζεται στην επιδιδυμίδα, η φρουκτόζη του εκσπερμάτισματος είναι φυσιολογική (57). Ο απεκκριτικός

πόρος κάθε σπερματοδόχου κύστης συνενώνεται με τη λήκυθο του σπερματικού πόρου για να σχηματιστεί ο εκσπερματιστικός πόρος (1cm). Οι εκσπερματικοί πόροι διατρέχουν τον προστάτη και εκβάλλουν στην προστατική ουρήθρα (52).

### Προστάτης αδένας

Ο προστάτης είναι ο μεγαλύτερος επικουρικός αδένας του ανδρικού γεννητικού συστήματος. Είναι ένας αδenoϊνωματώδης αδένας, που φυσιολογικά έχει σχήμα κάστανου με διάμετρο 3,5–4,0 cm και βάρος 20 g. Περιβάλλει κυκλικά την ουρήθρα κάτω από τον αυχένα της ουροδόχου κύστης (26, 46, 53). Ο προστάτης περιβάλλεται στενά από μία ινοκολλαγονώδη κάψα, κάτω από την οποία υπάρχει μια παχιά στιβάδα λείων μυϊκών κυττάρων.

Το παρέγχυμα του προστάτη αποτελείται από 30-50 σωληνοκυψελοειδή αδένια με πόρους που εκβάλλουν στην προστατική ουρήθρα (58). Σύμφωνα με τον McNeal η διάταξη των προστατικών αδενίων περιγράφεται σε 3 ζώνες (59):

1. Κεντρική ζώνη από περιουρηθρικούς βλεννογόνιους αδένες που εκβάλλουν κατευθείαν στην προστατική ουρήθρα. Αντιπροσωπεύει το 20-25% του συνόλου της αδενικής μάζας.
2. Μεταβατική ζώνη από περιουρηθρικούς υποβλεννογόνιους αδένες που εκβάλλουν στην ουρήθρα μέσω μικρών πόρων. Αντιπροσωπεύει το 5-10% του συνόλου της αδενικής μάζας.
3. Περιφερική ζώνη από διακλαδισμένους αδένες που εκβάλλουν στην ουρήθρα μέσω μακρών πόρων. Αντιπροσωπεύει το 70-75% του συνόλου της αδενικής μάζας (59).

Στους ενήλικες άνδρες ο προστάτης είναι ένα διαρκώς ενεργό όργανο, το οποίο παράγει καθημερινά 0,5–2,0 ml προστατικού υγρού. Το προστατικό υγρό είναι αλκαλικό πλούσιο σε ψευδάργυρο και κιτρικό οξύ, ουσίες προερχόμενες αποκλειστικά από το όργανο αυτό, αποτελώντας τους βασικότερους βιοχημικούς δείκτες του. Επίσης ο προστάτης εκκρίνει την ειδική προστατική όξινη φωσφατάση, το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA), το κιτρικό οξύ, την ινωδολυσίνη και την αμυλάση. Το προστατικό υγρό συνιστά το 30% του συνολικού όγκου του σπερματικού υγρού και απαρτίζει το πρώτο κλάσμα της εκσπερμάτισης. Φέρει το μεγαλύτερο μέρος των σπερματοζωαρίων και έχει ρευστή υφή. Περιέχει τα ινωδολυτικά ένζυμα που επιτελούν τη ρευστοποίηση του σπέρματος (60).

Συνοπτικά οι κύριες λειτουργίες του προστάτη αδένος είναι (61):

- 1) Η εξουδετέρωση του όξινου περιβάλλοντος του κόλπου μέσω του αλκαλικού εκκρίματος
- 2) Η απόκτηση κινητικότητας των σπερματοζωαρίων
- 3) Η παροχή θρεπτικών ουσιών στα σπερματοζωάρια
- 4) Η ρευστοποίηση του σπέρματος

#### Βολβοουρηθραίοι αδένες

Οι βολβοουρηθραίοι αδένες ή αδένες του Cowper είναι δύο μικροί σωληνοκυψελοειδείς αδένες (διάμετρος: 5 χιλιοστά) που εντοπίζονται στο ουρογεννητικό τρίγωνο. Βρίσκονται στην άνω πλευρά της βάσης του πέους πίσω από το βολβό της ουρήθρας και μέσω μακρών και στενών πόρων εκβάλλουν στην πεϊκή ουρήθρα. Το έκκριμά τους είναι διαυγές ελαφρώς βλενώδες, πλούσιο σε γαλακτόζη, μέτριο σε σιαλικό οξύ και προηγείται της εξόδου του σπέρματος κατά τη συνουσία και την εκσπερμάτιση (53).

Η κύρια λειτουργία του εκκρίματος των βολβοουρηθραίων αδένων είναι προστατευτική και λιπαντική, μέσω της ουδετεροποίησης των όξινων υπολειμμάτων των ούρων που εντοπίζονται εκεί πριν από τη έξοδο των σπερματοζωαρίων, τα οποία είναι ευαίσθητα στο όξινο pH (62).

#### Πέος

Το πέος είναι το εξωτερικό γεννητικό όργανο του άρρενος και αποτελεί ταυτόχρονα τμήμα της αποχετευτικής μοίρας του ουροποιητικού συστήματος και της εκφορητικής μοίρας του γεννητικού συστήματος. Αποτελείται από τα δύο σηραγγώδη σώματα στη ραχιαία επιφάνεια και το σπογγώδες σώμα που περιβάλλει την ουρήθρα. Το σπογγώδες σώμα στην κορυφή του πέους σχηματίζει τη βάλανο.

Η κύρια λειτουργία του πέους σαν όργανο του ανδρικού γεννητικού συστήματος είναι η συμβολή στην αναπαραγωγή του ανθρώπινου είδους μέσω της εναπόθεσης του σπέρματος στον κόλπο της γυναίκας που επιτυγχάνεται με την στύση και την συνουσία (53).

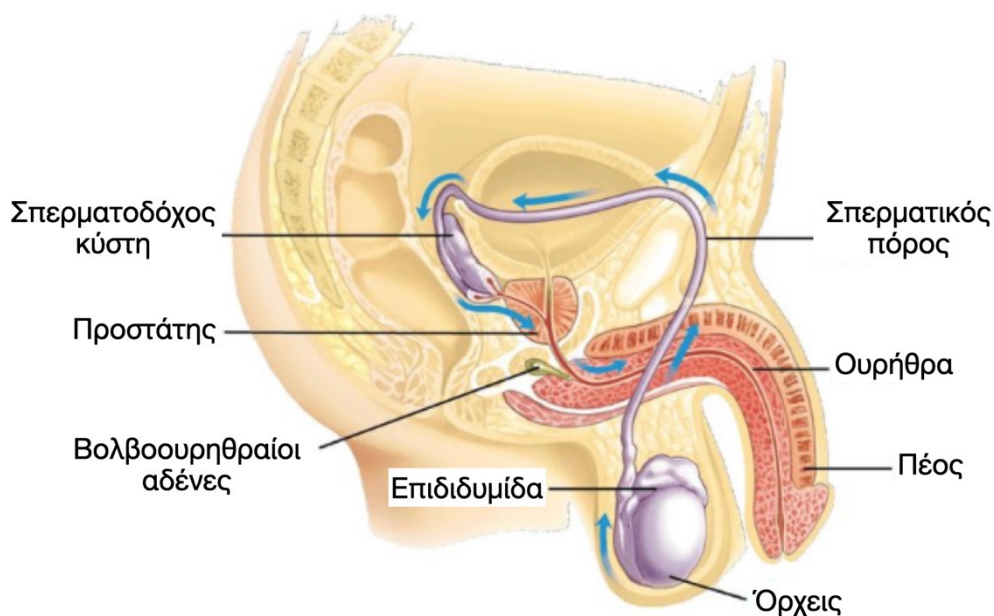
## Ουρήθρα

Η ανδρική ουρήθρα είναι ένας ινομυώδης σωλήνας με μήκος 18-20 cm. Εκτείνεται από τον αυχένα της ουροδόχου κύστης και πορεύεται μέσα στον προστάτη και στη συνέχεια στο βολβό και στο σπογγιώδες σώμα του πέους μέχρι το έξω στόμιο της ουρήθρας στην κορυφή της βαλάνου (53).

Η ανδρική ουρήθρα διακρίνεται σε τέσσερα ανατομικά τμήματα: την προστατική, την υμενώδη, τη βολβική και την πεικί ουρήθρα. Η προστατική μοίρα της ουρήθρας παρουσιάζει την ουρηθραία ακρολοφία και τις παραλοφίδες αύλακες εκατέρωθεν. Στο μέσον αυτής της ακρολοφίας υπάρχει μια πάχυνση, το σπερματικό λοφίδιο. Το σπερματικό λοφίδιο έχει στόμιο επιφανειακά που οδηγεί σε μία κοιλότητα που λέγεται προστατικός κόλπος. Εκατέρωθεν του στομίου αυτού εκβάλλουν οι εκσεματιστικοί πόροι (52, 53).

Κατά μήκος της ουρήθρας εντοπίζονται οι ουρηθραίοι αδένες του Littre που εκβάλλουν στον πυθμένα των ουρηθραίων κόλπων. Μαζί με το έκκριμα των βολβοουρηθραίων αδένων του Cowper που εκβάλλουν στην ουρήθρα, έχουν ρόλο λιπαντικό και προστατευτικό πριν την εκσπερμάτιση (62).

Η ανδρική ουρήθρα καταλήγει στη κορυφή του πέους, σε μια διευρυμένη περιοχή που ονομάζεται σκαφοειδής βόθρος κι από εκεί εκβάλλει μέσω του έξω στομίου της στην κορυφή της βαλάνου (53).



**Εικόνα 4.** Το ταξίδι του σπέρματος στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα πριν την εκσπερμάτιση (63).

## Φυσιολογία του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος

### Άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-όρχεις

Ο αναπαραγωγικός άξονας του άρρενος είναι ένα εξαιρετικά αποτελεσματικό, καλά οργανωμένο και διαχειριζόμενο με ακρίβεια βιολογικό σύστημα που έχει εξελιχθεί εδώ και εκατομμύρια χρόνια. Ο άξονας υποθαλάμος-υπόφυση-γονάδες (HPG) παίζει σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της ενηλικίωσης σε τέσσερις φυσιολογικές διαδικασίες: 1) την διαφοροποίηση του γεννητικού συστήματος του άνδρα κατά την εμβρυική ζωή, 2) την προαγωγή της σεξουαλικής ωρίμανσης κατά την εφηβεία, 3) την ενδοκρινική λειτουργία των όρχεων - παραγωγή τεστοστερόνης και 4) την εξωκρινή λειτουργία των όρχεων - παραγωγή σπερματοζωαρίων (54).

### Υποθάλαμος

Ως κέντρο συλλογής πληροφοριακών στοιχείων του άξονα HPG, ο υποθάλαμος δέχεται σήματα από την αμυγδαλή, το θάλαμο, τη γέφυρα, τον αμφιβληστροειδή, τον οσφρητικό φλοιό και πολλές άλλες περιοχές. Ο υποθάλαμος συνδέεται ανατομικά με την υπόφυση διαμέσου του πυλαίου αγγειακού συστήματος και των νευρωνικών οδών. Παρακάμπτοντας τη συστηματική κυκλοφορία, το πυλαίο αγγειακό σύστημα επιτρέπει την άμεση παροχή υποθαλαμικών ορμονών στην πρόσθια υπόφυση (64).

Η πιο σημαντική ορμόνη του υποθαλάμου για την αναπαραγωγή είναι η εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (GnRH) ή εκλυτική ορμόνη της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LHRH), ένα πεπτίδιο 10 αμινοξέων που εκκρίνεται από τον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου. Επί του παρόντος, η μόνη γνωστή λειτουργία της GnRH είναι η διέγερση της παραγωγής και της έκκρισης της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) και της θυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) από την πρόσθια υπόφυση. Η GnRH έχει χρόνο ημίσειας ζωής στο πλάσμα περίπου 5 έως 7 λεπτά και αποδομείται γρήγορα από την υπόφυση. Η έκκριση της GnRH εξαρτάται από την επίδραση του στρες, της άσκησης, των γοναδοτροπινών που εκκρίνονται από την υπόφυση και των γεννητικών ορμονών που εκκρίνονται από τον όρχι στη συστηματική κυκλοφορία (64, 65).

Στο σύνδρομο Kallmann, που χαρακτηρίζεται από συγγενή υπογοναδοτροπικό υπογοναδισμό, δεν πραγματοποιείται η προγραμματισμένη μετανάστευση των νευρώνων της GnRH από την οσφρητική ταινία στον υποθάλαμο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης.

Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την απουσία έκκρισης από τον υποθάλαμο της GnRH (66). Οι άνδρες με σύνδρομο Kallmann παρουσιάζουν καθυστερημένη ήβη ή στειρότητα λόγω έλλειψης παραγωγής τεστοστερόνης (67).

Ο ρυθμός έκκρισης της GnRH επηρεάζεται: α) από την εποχή, με αιχμή την άνοιξη και β) από τον κερκάρδιο κύκλο, με υψηλότερα επίπεδα τεστοστερόνης κατά τις πρώτες πρωινές ώρες. Η GnRH απελευθερώνεται κατά παλμούς διάρκειας περίπου 90 έως 120 λεπτά στην πυλαία κυκλοφορία του εγκεφάλου (68).

### Υπόφυση

Η υπόφυση βρίσκεται στη βάση του εγκεφάλου μέσα στο τουρκικό εφίπιο και συνδέεται με τον υποθάλαμο με τον μίσχο της υπόφυσης. Η υπόφυση διακρίνεται σε δύο λοβούς: τον οπίσθιο και τον πρόσθιο. Ο οπίσθιος λοβός που ονομάζεται νευροϋπόφυση είναι υπεύθυνος για την έκκριση δύο ορμονών, της ωκυτοκίνης (OXT) και της αντιδιουρητικής ορμόνης (ADH). Η νευροϋπόφυση ρυθμίζεται από νευρικά ερεθίσματα. Αντίθετα, η πρόσθια υπόφυση, η αδενοϋπόφυση, ρυθμίζεται από παράγοντες που εντοπίζονται στην κυκλοφορία του αίματος και είναι η θέση δράσης της GnRH (54).

Η GnRH διεγείρει την παραγωγή και την έκκριση της FSH και της LH. Η ευαισθησία των γοναδοτρόπων κυττάρων της υπόφυσης για την GnRH ποικίλλει ανάλογα με την ηλικία και την ορμονική κατάσταση ενός ατόμου. Οι LH και FSH είναι οι κύριες ορμόνες της υπόφυσης και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην λειτουργία των όρχεων. Είναι γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούνται από δύο πολυπεπτιδικές υποομάδες, την α και την β, καθεμία από τις οποίες κωδικοποιείται από ένα ξεχωριστό γονίδιο. Η α υποομάδα είναι κοινή για την FSH, την LH, τη β-χοριακή γοναδοτροπίνη (β-hCG) και τη θυρεοειδοτρόπο ορμόνη (TSH). Οι διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες των ορμονών αυτών οφείλονται στην διαφορετική β υποομάδα. Και οι δύο υποομάδες απαιτούνται για την ενδοκρινική τους δράση (54).

Η απελευθέρωση της LH στη συστηματική κυκλοφορία γίνεται κατά κύματα, με συχνότητα από 8 έως 16 παλμούς το 24ώρο. Η συχνότητα αυτή αντικατοπτρίζει στενά την απελευθέρωση της GnRH. Τόσο τα ανδρογόνα όσο και τα οιστρογόνα ρυθμίζουν την έκκριση LH μέσω αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης. Η έκκριση της FSH πραγματοποιείται κατά ώσεις, με παλμό περίπου κάθε 1,5 ώρα. Η FSH έχει χρόνο ημίσειας ζωής 3 ώρες, ενώ η LH έχει 20 λεπτά (28).

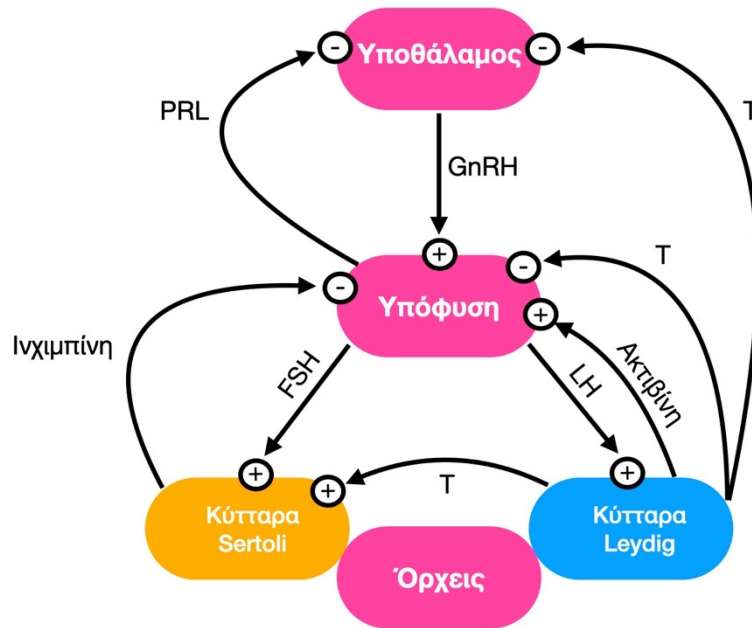


Η απόκριση της FSH στην GnRH είναι πιο δύσκολο να εκτιμηθεί από εκείνη της LH για δύο λόγους: (1) Η FSH έχει μικρότερο εύρος απόκρισης και μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής στον ορό και (2) οι γοναδικές πρωτεΐνες Ινχιμπίνη και Ακτιβίνη μπορεί να επηρεάσουν την έκκριση της FSH και θεωρείται ότι συμβάλλουν στη εκκριτική ανεξαρτησία της FSH από την έκκριση της GnRH.

Η FSH και η LH είναι γνωστό ότι δρουν μόνο στις γονάδες. Ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση, η οποία οδηγεί σε αύξηση του κυκλικού αδενοσινο-μονοφωσφορικού οξέος (cAMP). Στους όρχεις, η LH διεγείρει τη στεροειδογένεση στα κύτταρα Leydig προκαλώντας τη μετατροπή της χοληστερόλης σε πρεγνενολόνη και τεστοστερόνη. Η FSH δρά στα κύτταρα Sertoli των όρχεων και είναι ο κύριος διεγέρτης της ανάπτυξης των σπερματικών σωληναρίων. Επίσης είναι απαραίτητη για την έναρξη της παραγωγής σπερματοζωαρίων που συμβαίνει κατά την εφηβεία. Στον ενήλικα, ο κύριος ρόλος της FSH είναι η διέγερση και η πρόκληση της σπερματογένεσης (54).

Μια τρίτη ορμόνη της πρόσθιας υπόφυσης, η προλακτίνη (PRL), μπορεί επίσης να επηρεάσει τον άξονα HPG και τη γονιμότητα. Η PRL είναι μια μεγάλη, σφαιρική πρωτεΐνη 199 αμινοξέων (23 kD) που είναι υπεύθυνη για τη παραγωγή γάλακτος κατά τη λοχεία (54). Στον άνθρωπο δεν έχουν βρεθεί μεταλλάξεις ούτε στο γονίδιο της PRL ούτε στον υποδοχέα της (69). Ο φυσιολογικός ρόλος της PRL στους άνδρες είναι λιγότερο γνωστός, αλλά πιθανότατα αυξάνει τη συγκέντρωση των υποδοχέων LH στα κύτταρα Leydig και διατηρεί σε φυσιολογικά, τα υψηλά επίπεδα ενδοορχικής τεστοστερόνης. Μπορεί επίσης να ενισχύει την δράση των ανδρογόνων στην ανάπτυξη και την εκκριτική λειτουργία των επικουρικών γεννητικών αδένων του άνδρα (70, 71). Τα ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα της PRL είναι υπεύθυνα για την απώλεια ή τη πτώση της λίμπιντο. Αν και τα χαμηλά επίπεδα προλακτίνης δεν είναι απαραίτητα παθολογικά, η υπερπρολακτιναιμία παρεμποδίζει την παλμική έκκριση της GnRH (72).

Επιπλέον, η πρόσθια υπόφυση περιέχει κύτταρα που εκκρίνουν άλλες γλυκοπρωτεϊνικές ορμόνες όπως: τη αδρενοκορτικοτρόπο ορμόνη (ACTH), τη αυξητική ορμόνη (GH) και την θυρεοειδοτρόπο ορμόνη (TSH). Αυτές οι γλυκοπρωτεϊνικές ορμόνες μπορούν επίσης να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην αναπαραγωγική ικανότητα των ανδρών (73, 74).



**Εικόνα 5.** Διάγραμμα του άξονα υποθάλαμου-υπόφυσης-όρχεως. (τροποποιημένη αναφορά)  
 (+): θετική παλίνδρομη ρύθμιση, (-): αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση, FSH: θυλακιοτρόπος ορμόνη,  
 GnRH εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών, LH: ωχρινοτρόπος ορμόνη, PRL: προλακτίνη,  
 T: τεστοστερόνη.

## Όρχεις

Τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου και η γονιμοποιητική ικανότητα του άνδρος απαιτούν τη συνεργασία της εξωκρινούς και της ενδοκρινούς μοίρας των όρχεων. Το διάμεσο διαμέρισμα, που αποτελείται κυρίως από κύτταρα Leydig, είναι υπεύθυνο για τη στεροειδογένεση. Στα σπερματικά σωληνάκια πραγματοποιείται η παραγωγή σπερματοζωαρίων (52).

Η φυσιολογική παραγωγή τεστοστερόνης (T) στους άνδρες είναι περίπου 5 g/ημέρα. Ο ρυθμός έκκρισης της τεστοστερόνης παρουσιάζει διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια της ημέρας, με τις υψηλότερες τιμές να παρατηρούνται τις πρωινές ώρες και τις χαμηλότερες τις βραδινές ώρες, ακολουθώντας με αυτό τον τρόπο την κατά ώσεις έκκριση της LH.

Η τεστοστερόνη μεταβολίζεται σε δύο κύριους ενεργούς μεταβολίτες στα κύτταρα-στόχο: (1) στο βασικό μεταβολίτη της που έχει ανδρογονική δράση, την διυδροτεστοστερόνη (DHT) με τη βοήθεια του ενζύμου 5α-αναγωγάση και (2) σε μία ορμόνη με οιστρογόνο δράση, την οιστραδιόλη (E2) μέσω της δράσης της αρωματάσης. Η DHT είναι πολύ πιο ισχυρό ανδρογόνο από ότι η τεστοστερόνη. Στους περισσότερους

περιφερικούς ιστούς, απαιτείται η μετατροπή της τεστοστερόνης σε DHT για να υπάρξει η δράση των ανδρογόνων, αλλά στους όρχεις και τους σκελετικούς μύες, η μετατροπή σε DHT δεν είναι απαραίτητη για την ορμονική τους δράση (28).

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες τα επίπεδα της τεστοστερόνης πλάσματος στους άνδρες κυμαίνονται από 300 έως 1100 ng/dl. Από αυτά μόλις το 2% αποτελούν την ελεύθερη μορφή της τεστοστερόνης (FT), με το υπόλοιπο 98% να είναι συνδεδεμένο με πρωτεΐνες και συνεπώς ανενεργό. Το 44% περίπου της τεστοστερόνης που κυκλοφορεί στο αίμα, είναι συνδεδεμένο πολύ ισχυρά με μία β-σφαιρίνη, τη σφαιρίνη που δεσμεύει τις ορμόνες του φύλου (SHBG). Η SHBG είναι ετεροδιμερής γλυκοπρωτεΐνη, με μοριακό βάρος 95kDa, η οποία παράγεται από το ήπαρ και έχει μεγάλη χημική συγγένεια με την τεστοστερόνη και την DHT. Η συγκέντρωσή της στον ορό μεταβάλλεται από διάφορους παράγοντες. Συγκεκριμένα, παρατηρείται αύξηση της SHBG από τη δράση των οιστρογόνων, της θυροξίνης και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως η οξεία και χρόνια ηπατική ανεπάρκεια και ο υπογοναδισμός. Αντίθετα, παρατηρείται μείωση των επιπέδων της SHBG στον ορό από τη δράση των ανδρογόνων, των κορτικοειδών και σε καταστάσεις όπως η παχυσαρκία και η υπολευκωματιναιμία. Η SHBG, εκτός από την τεστοστερόνη, συνδέεται με μικρότερη χημική συγγένεια με την E2 και με την DHT. Το υπόλοιπο 54% περίπου της τεστοστερόνης είναι σε ασθενή σύνδεση με λευκωματίνες. Από αυτό το τελευταίο κλάσμα η τεστοστερόνη απελευθερώνεται με μεγάλη ευκολία και εισέρχεται στα κύτταρα στόχους (54, 75, 76).

Η FSH δρά στα κύτταρα Sertoli και προσδένεται σε ειδικούς υποδοχείς για την ενεργοποίηση της παραγωγής σημαντικών παραγόντων για τη σπερματογένεση όπως η δεσμεύουσα τα ανδρογόνα πρωτεΐνη (ABP), η τρανσφερίνη, τα γαλακτικά οξέα, η σερουλοπλασμίνη, η απολιποπρωτεΐνη J, ο ενεργοποιητής πλασμινογόνου, οι προσταγλανδίνες και οι αυξητικοί παράγοντες. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι μελέτες σε γενετικά ελλειμματικά ποντίκια στην FSH (knockout mouse) δείχνουν ότι η FSH δεν είναι απαραίτητη για τη σπερματογένεση, επειδή τα ποντίκια που έχουν προσβληθεί μπορεί να είναι γόνιμα (77). Στον άνθρωπο θεωρείται ότι είναι απαραίτητη η παρουσία της FSH για τη φυσιολογική σπερματογένεση (78).

Οι όρχεις παράγουν επίσης τις πρωτεϊνικές ορμόνες ινχιμίνη και ακτιβίνη (79). Η ινχιμίνη είναι μια πρωτεΐνη 32-kD η οποία εκκρίνεται από τα κύτταρα Sertoli και αναστέλλει την απελευθέρωση της FSH από την υπόφυση. Μέσα στους όρχεις, η παραγωγή της ινχιμίνης διεγείρεται από την FSH και δρα με αρνητική παλίνδρομη

ρύθμιση στην υπόφυση ή στον υποθάλαμο. Η παραγωγή της ινχμπίνης μπορεί να μειωθεί ή να ανασταλλεί όταν υπάρχει σοβαρή βλάβη στο σπερματικό επιθήλιο και ως αποτέλεσμα παρατηρείται η σημαντική αύξηση της FSH. Οι υψηλές τιμές της FSH πλάσματος αποτελούν έναν δείκτη που αντικατοπτρίζει τη βλάβη του σπερματικού επιθηλίου (80).

Η ακτιβίνη είναι μια πρωτεΐνη που παράγεται στους όρχεις και έχει στενή δομική συγγένεια με τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού β (Transforming Growth Factor β, TGF-β) και ασκεί διεγερτική επίδραση στην έκκριση της FSH. Οι υποδοχείς της ακτιβίνης βρίσκονται σε μια πληθώρα εξωγοναδικών ιστών, υιοθετώντας την άποψη ότι η ακτιβίνη ίσως έχει ρόλο αυξητικού παράγοντα ή ρυθμιστικό ρόλο στο σώμα (81).

Η αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση της απελευθέρωσης της GnRH από την τεστοστερόνη συμβαίνει μέσω των ανδρογονικών υποδοχέων (ARs) που εδράζονται στους υποθαλαμικούς νευρώνες και στην υπόφυση. Σε μελέτες γενετικών μεταλλάξεων, είναι σαφές ότι η τεστοστερόνη και τα οιστρογόνα συμμετέχουν στην αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση. Η αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση είναι αποτέλεσμα της δέσμευσης του AR από την τεστοστερόνη και σε μικρότερο βαθμό από την οιστραδιόλη (82). Η ανασταλτική δράση της τεστοστερόνης ασκείται κυρίως στον υποθάλαμο ενώ των οιστρογόνων στην υπόφυση (83). Φαίνεται επίσης, ότι παρόλο που η τεστοστερόνη είναι ο κύριος ρυθμιστής της έκκρισης της LH, η οιστραδιόλη (μαζί με την ινχμπίνη από κύτταρα Sertoli) είναι ο κύριος ρυθμιστής της έκκρισης της FSH (84).

#### Η γήρανση και ο άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-όρχεις

Με την πάροδο της ηλικίας παρατηρείται μια σταδιακή αλλά σταθερή πτώση των επιπέδων της τεστοστερόνης και της παραγωγής σπερματοζωαρίων, με αποτέλεσμα στους άνδρες της έβδομης δεκαετίας της ζωής να έχουν περίπου 35% χαμηλότερα τα επίπεδα της τεστοστερόνης στην κυκλοφορία του αίματος σε σχέση με τους νεότερους άνδρες (85). Ως αποτέλεσμα της ανεπάρκειας των ανδρογόνων το φαινόμενο αυτό έχει ονομαστεί με διάφορους όρους όπως ανδρική εμμηνόπαυση, ανδρική κλιμακτήριος, ανδρόπαυση ή ως μερική ανεπάρκεια ανδρογόνων στο γηράσκοντα άνδρα (PADAM). Οι αλλαγές στο σπερματικό επιθήλιο με την πάροδο της ηλικίας περιλαμβάνουν μειώσεις στον όγκο και στο μήκος των σπερματικών σωληναρίων.

Η με την πάροδο της ηλικίας μείωση της παραγωγής σπερματοζωαρίων σε γηράσκοντες όρχεις φαίνεται να οφείλεται στον μειωμένο πολλαπλασιασμό των γεννητικών κυττάρων παρά στην αυξημένη κυτταρική απόπτωση. Αντίστοιχα, τα επίπεδα

της FSH αυξάνονται επίσης με την πάροδο της ηλικίας, με τις εργαστηριακές τιμές να είναι έως τριπλάσιες στους μεγαλύτερους σε σχέση με τους νεότερους άνδρες. Η με την πάροδο της ηλικίας μείωση της λειτουργίας του άξονα HPG είναι πολυπαραγοντική. Η παραγωγή τεστοστερόνης μειώνεται λόγω λιγότερων κυττάρων Leydig και περισσότερων πρωτεϊνών που δεσμεύουν τη τεστοστερόνη. Η νυχθημερήσια διακύμανση της έκκρισης της τεστοστερόνης χάνεται επίσης σε πολλούς ηλικιωμένους άνδρες. Με την πάροδο της ηλικίας, υπάρχουν επίσης ενδείξεις για μία αμβλυμένη απάντηση της παλίνδρομης ρύθμισης του άξονα HPG στα χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης (παρά τα γενικά υψηλά επίπεδα γοναδοτροπινών) και στη διέγερση GnRH. Τέλος, η φυσιολογική παλμική απελευθέρωση της GnRH αντικαθίσταται από ακανόνιστους παλμούς που είναι λιγότερο αποτελεσματικοί στη διέγερση της απελευθέρωσης γοναδοτροπινών. Ένας συνδυασμός αυτών των επιδράσεων είναι πιθανότατα υπεύθυνος για τη μειωμένη λειτουργία του άξονα HPG με την πάροδο της ηλικίας (86).



## Εμβρυολογία του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος

Ο καθορισμός και η διαφοροποίηση του ανδρικού φύλου στον άνθρωπο είναι ένα γενετικά προκαθορισμένο γεγονός. Εξαρτάται από την επιλογή των φυλετικών χρωμοσωμάτων X και Y κατά τη γονιμοποίηση του ωαρίου από το σπερματοζώαριο. Στο ανθρώπινο είδος το γενετικό φύλο καθορίζεται από τον συνδυασμό των χρωμοσωμάτων που είναι ως γνωστόν XY για το άρρεν φύλο και XX για το αντίστοιχο θήλυ (87).

Το γοναδικό φύλο ολοκληρώνεται με την διαφοροποίηση της αρχέγονης αδιαφοροποίητης ή αμφιδύναμης γονάδας σε όρχι στους άνδρες ή ωοθήκη στις γυναίκες (88). Το γεγονός αυτό εξαρτάται από την έκφραση ενός γονιδίου που είναι υπεύθυνο για τον καθορισμό του φύλου, το SRY (Sex Determining Region Y, Περιοχή Φυλοκαθορισμού του Y) το οποίο εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος Y (89). Το γονίδιο SRY στο χρωμόσωμα Y είναι υπεύθυνο για την ανάπτυξη των όρχεων στους άντρες από την διαφοροποίηση της αρχέγονης αμφιδύναμης γονάδας. Η αδιαφοροποίητη γονάδα μπορεί να ακολουθήσει δύο αναπτυξιακές οδούς, την οδό διαφοροποίησης προς όρχι ή προς ωοθήκη. Με βάση το γενετικό φύλο πραγματοποιείται και η διαφοροποίηση. Κατά την εμβρυική ανάπτυξη, στα πρώιμα στάδια και τα δύο φύλα έχουν αμφιδύναμες εσωτερικές δομές. Αυτές είναι οι μεσονεφρικοί πόροι και οι παραμεσονεφρικοί πόροι. Στα άρρενα έμβρυα παρατηρείται η εκφύλιση των παραμεσονεφρικών πόρων, ενώ στα θήλεα η εκφύλιση των μεσονεφρικών πόρων (90).

Η διαδικασία που ακολουθεί ονομάζεται φυλετική διαφοροποίηση και είναι επακόλουθο της απελευθέρωσης ειδικών γενετικών ορμονών από τις γονάδες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη των φυλετικών χαρακτηριστικών όπως είναι τα εξωτερικά γεννητικά όργανα (91). Οι διεργασίες ολοκλήρωσης του φυλετικού φαινότυπου λαμβάνουν χώρα μετά τη γέννηση και κυρίως κατά την εφηβεία και αναφέρονται ως φυλετική ανάπτυξη. Περιλαμβάνουν την ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου, όσο και την απόκτηση της γονιμοποιητικής ικανότητας (92).

Το μονοπάτι που οδηγεί στο σχηματισμό ενός φύλου ή του άλλου βασίζεται σε ένα καλά ρυθμιζόμενο δίκτυο μορίων κυτταρικής σηματοδότησης και μεταγραφικών παραγόντων (93). Έτσι ο φαινότυπος της σεξουαλικής διαφοροποίησης είναι το αποτέλεσμα πολλών διαδοχικών γεγονότων: την εμφάνιση της αρχέγονης αδιαφοροποίητης γονάδας, την ανάπτυξη της γονάδας, την παραγωγή γενετικών ορμονών του φύλου και τελικά τη διαφοροποίηση φύλου (94).

### Μορφογένεση όρχεων

Ο φυλετικός καθορισμός ολοκληρώνεται με τη διαφοροποίηση της αρχέγονης αμφιδύναμης γονάδας και τον σχηματισμό κυττάρων Sertoli των όρχεων ή κοκκιώδη κύτταρα της ωοθήκης, κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής (95, 96). Στον άνθρωπο, η παρουσία του χρωμοσώματος Y και συγκεκριμένα του γονιδίου SRY, ο οποίος εκφράζεται κατά την 6<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης, αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα που κατευθύνει την αρχέγονη γονάδα στη διαφοροποίηση και ανάπτυξη ενός λειτουργικού όρχεως. Η έκφραση του SRY ενισχύεται από τα γονίδια WNT1 και SF1 (97, 98). Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το SRY συνδέεται με τον στεροειδογόνο παράγοντα 1 (SF1), σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο που διεγείρει την έκφραση του SRY-box 9 (SOX9) στα πρόδρομα κύτταρα Sertoli (99, 100). Έπειτα αφού εκφραστεί, το SOX9 με τη σειρά του ενεργοποιεί αρκετές πρωτεΐνες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των όρχεων, όπως η συνθάση της προσταγλανδίνης D (PGDS), ένα ένζυμο που καταλύει τον ισομερισμό του PGH<sub>2</sub>. Τα γονίδια αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά, γιατί διατηρούν σε υψηλά επίπεδα την έκφραση του SOX9 μέσω θετικής παλίνδρομης ρύθμισης (101).

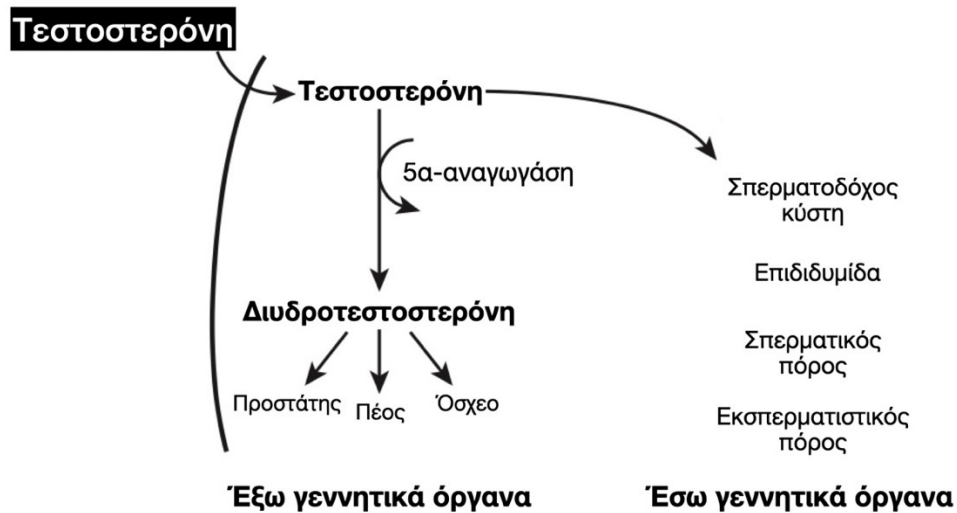
Η έκφραση του SRY αναστέλλεται από την υπερέκφραση των WNT4 και DAX1. Το DAX1, ένα γονίδιο που εκφράζει έναν πυρηνικό υποδοχέα ορμονών, μπορεί να τροποποιήσει τη δραστηριότητα του SRY κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης μέσω της έκφρασης γονιδίων που αναστέλλουν τη δράση του. Το WNT4, που περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό στις ωοθήκες των ενηλίκων, μπορεί επίσης να χρησιμεύσει ως γονίδιο «αντίστασης». Η ανακάλυψη αυτών των γονιδίων έχει αλλάξει τις θεωρίες του φυλετικού προσδιορισμού (102, 103). Στο παρελθόν, ο γονότυπος του θήλεως είχε χαρακτηριστεί ως το «προεπιλεγμένο», SRY αρνητικό, αναπτυξιακό μονοπάτι. Είναι πλέον σαφές ότι γονίδια όπως τα WNT4 και DAX1 μπορεί να προκαλέσουν την ανάπτυξη των γονάδων του θήλεως, ακόμη και με παρουσία του SRY (104).

### Μορφογένεση γεννητικών οργάνων του άρρενος

Μετά την ολοκλήρωση του γοναδικού φύλου, περίπου την 7<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης, τα κύτταρα Leydig εκκρίνουν τεστοστερόνη η οποία είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη των έσω γεννητικών οργάνων (Εικόνα 6). Τα κύτταρα Leydig συνθέτουν επίσης και την ινσουλινόμορφο παράγοντα 3 (Insulin like 3, INSL3). Η INSL3 είναι ένα πεπτίδιο που ρυθμίζεται από την hCG αρχικά και την LH στη συνέχεια και συμβάλλει στην κάθοδο των



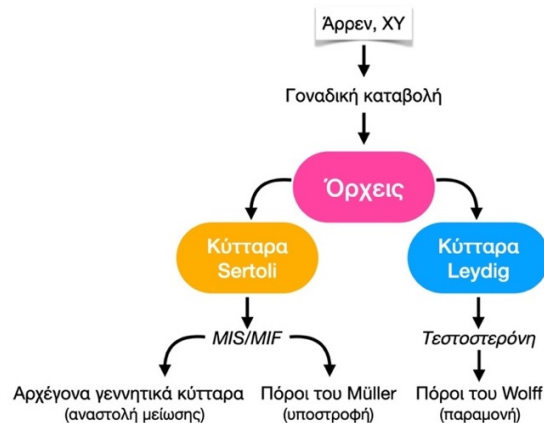
όρχεων. Μεταλλάξεις των γονιδίων της INSL3 και του υποδοχέα της έχουν σαν αποτέλεσμα ανωμαλίες καθόδου των όρχεων και έχουν περιγραφεί σε άτομα με κρυπορχία (105-107).



**Εικόνα 6.** Διάγραμμα ανάπτυξης έξω και έσω γεννητικών οργάνων. Η τεστοστερόνη είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη των έσω γεννητικών οργάνων, ενώ η διυδροτεστοστερόνη για την ανάπτυξη των έξω γεννητικών οργάνων.

Η τεστοστερόνη μετατρέπεται σε διυδροτεστοστερόνη (DHT) από το ένζυμο 5α-αναγωγάση. Η DHT είναι η κύρια υπεύθυνη ορμόνη για την αρρενοποίηση των έξω γεννητικών οργάνων (108). Τα επίπεδα των ανδρογόνων και κυρίως της DHT κορυφώνονται κατά το μέσο της κύησης με αποτέλεσμα την αύξηση του πέους. Επίσης τα ανδρογόνα είναι υπεύθυνα για την κάθοδο των όρχεων στο όσχεο τους τελευταίους δύο μήνες της κύησης. Για το λόγο αυτό, σε άνδρες με συγγενή ανεπάρκεια των γοναδοτροπινών παρατηρείται μικροφαλία και κρυπορχία. Συμπερασματικά, απαραίτητες ορμόνες για την κάθοδο των όρχεων είναι η τεστοστερόνη και η INSL3 (109).

Η τεστοστερόνη συμμετέχει στη διαφοροποίηση των πορών του wolff και το σχηματισμό της επιδιδυμίδας, του σπερματικού πόρου και της σπερματοδόχου κύστης. Όταν απουσιάζει η τεστοστερόνη, οι πόροι αυτοί εκφυλίζονται. Από την άλλη μεριά, η αντιμυλλέριος ορμόνη (AMH), η οποία εκκρίνεται από τα κύτταρα Sertoli, εμποδίζει την ανάπτυξη των πόρων του Muller και προκαλεί την υποστροφή τους. Σε γενικές γραμμές, ελλείψεις σε αυτές τις αναπτυξιακές οδούς, έχουν σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση γενετικών ανωμαλιών ή διεμφυλικών ατόμων [Εικόνα 7] (110, 111).



**Εικόνα 7.** Διαφοροποίηση ανδρικού φύλου στον άνθρωπο. *MIS/MIF*, αντιμυλλέριος ορμόνη.

### Ανάπτυξη του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-όρχεις

Η αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση των στεροειδών ορμονών στον άξονα HPG ωριμάζει κατά τη διάρκεια της κύησης. Η κισπεπτίνη είναι μία ορμόνη, η οποία είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση των νευρώνων GnRH μέσω των οποίων πυροδοτείται η ενεργοποίηση της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (GnRH). Επιπλέον ο στεροειδογόνος παράγοντας 1 (SF-1), ένας πυρηνικός υποδοχέας, που εκκρίνεται από τα κύτταρα Sertoli, συμβάλλει στην ανάπτυξη του άξονα HPG (112).

Αμέσως μετά τη γέννηση παρατηρείται απώλεια της αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης από τα στεροειδή που εκκρίνονται από τον πλακούντα και για το λόγο αυτό υπάρχει μια περίοδος υψηλής έκκρισης γοναδοτροπινών στο νεογνό (μίνι-εφηβεία). Στη συνέχεια μετά από 3-4 μήνες, καθώς αυξάνεται η ευαισθησία του άξονα στις γοναδοτροπίνες, οι εκκρίσεις των FSH και LH φτάνουν σε πολύ χαμηλά επίπεδα και δεν αυξάνουν ξανά μέχρι την έναρξη της εφηβείας. Η εφηβεία ξεκινά με την αργή και συχνή (παλμική) απελευθέρωση της GnRH, που οδηγεί στην απελευθέρωση των γοναδοτροπινών σε επίπεδα ενηλίκων. Η FSH και η LH στη συνέχεια διεγείρουν την παραγωγή ορμονών και άλλων παραγόντων από τους όρχεις (113).

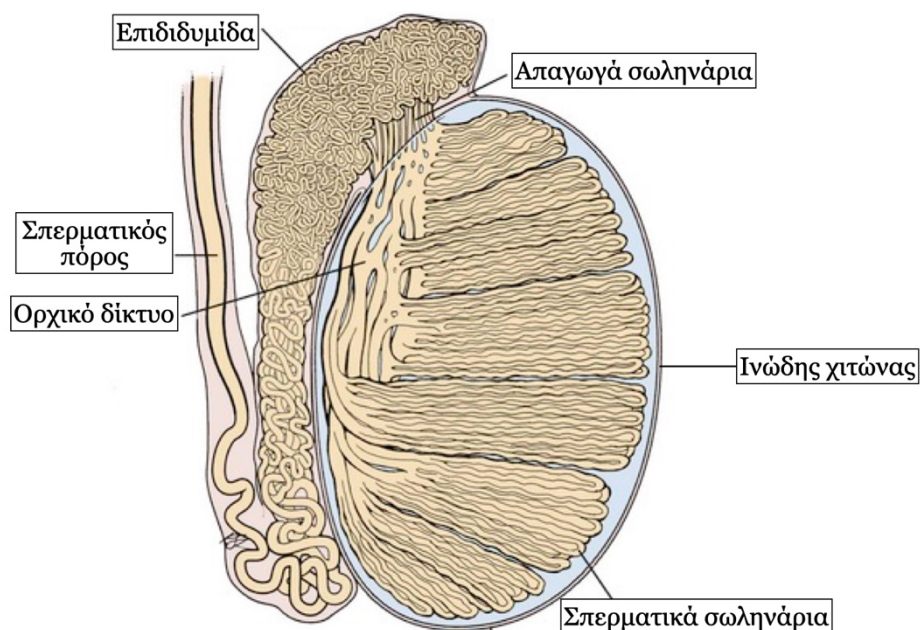
Η κατά ώσεις έκκριση GnRH από τον υποθάλαμο λαμβάνει χώρα κατά την εφηβεία, συνήθως ξεκινάει από το 12ο έτος στους άνδρες. Η εφηβεία ξεκινάει με ραγδαίες βιοσωματικές αλλαγές και επιτάχυνση του ρυθμού αύξησης και πιθανότατα να οφείλεται στη δράση της κισπεπτίνης, της μελατονίνης και της λεπτίνης (114). Η λεπτίνη, είναι μία πεπτιδική ορμόνη που παράγεται από το λιπώδη ιστό, αυξάνει τα αποθέματα λίπους και υπάρχουν αυξημένες ενδείξεις ότι η λεπτίνη ρυθμίζει την δραστηριότητα του υποθαλάμου και της υπόφυσης (115, 116).

## Ορχικό μικροπεριβάλλον

### Μικροαρχιτεκτονική όρχεως

Ο όρχις είναι ένα λευκό, ωοειδές όργανο που έχει φυσιολογικό όγκο 15 έως 25 ml και μήκος 4,5 έως 5,1 cm (21). Εξωτερικά περιβάλλεται από τον ινώδη χιτώνα, μια παχιά κάψα ινομυώδους συνδετικού ιστού (117). Οι λείες μυικές ίνες του ινώδους χιτώνα προσδίδουν συσταλτικότητα στους όρχεις, επηρεάζουν τη ροή του αίματος στους όρχεις και συμβάλλουν στην προώθηση του υγρού των σπερματικών σωληναρίων από τους όρχεις (36).

Ο ινώδης χιτώνας παχύνεται στην οπίσθια επιφάνεια του όρχι και σχηματίζει το μεσαύλιο ή σώμα του Highmore, από το οποίο ινώδη διαφραγμάτια ξεκινούν και εισέρχονται μέσα στον αδένα και τον διαιρούν σε 250-300 ορχικά λόβια. Κάθε ορχικό λόβιο εμπεριέχει 1 έως 4 σπερματικά σωληνάρια και το καθένα έχει μήκος περίπου 80 cm. Ανάμεσα στα σπερματικά σωληνάρια βρίσκεται ο διάμεσος ιστός, ένα δίκτυο χαλαρού συνδετικού ιστού πλούσιου σε αιμοφόρα αγγεία, λεμφοφόρα αγγεία, νεύρα και τα διάμεσα κύτταρα του Leydig. Στον άνθρωπο, ο διάμεσος ιστός καταλαμβάνει το 20% έως 30% του συνολικού όγκου των όρχεων (118, 119).



**Εικόνα 8.** Η μικροαρχιτεκτονική των όρχεων στην οποία απεικονίζονται τα σπερματικά σωληνάρια (μήκους 250 μέτρα), η επιδιδυμίδα (μήκους 3 έως 4 μέτρα) και ο σπερματικός πόρος. [Τροποποιημένη αναφορά από Hirsh AV. The anatomical preparations of the human testis and epididymis in the Glasgow Hunterian Collection. Hum Reprod Update 1995;1:515–21.] (120)

Τα σπερματικά σωληνάρια εμφανίζουν μία εσπειραμένη μοίρα, όπου πραγματοποιείται η παραγωγή των σπερματοζωαρίων και μια ευθεία μοίρα που αποτελεί την αποχετευτική οδό. Τα εσπειραμένα σπερματικά σωληνάρια είναι μεγάλου μήκους έντονα περιελιγμένα και επενδύονται από πολύστιβο επιθήλιο το οποίο αποτελείται από δύο κυτταρικούς πληθυσμούς: το σπερματικό επιθήλιο και τα κύτταρα Sertoli.

Το σπερματικό επιθήλιο, το οποίο αποτελείται από γεννητικά κύτταρα σε διάφορα στάδια σπερματογένεσης και σπερμιογένεσης. Η λειτουργία τους είναι η παραγωγή σπερματοζωαρίων. Εδώ, τα σπερματοζωάρια παράγονται με ρυθμό περίπου χιλιάδων ανά δευτερόλεπτο. Τα κύτταρα Sertoli διατάσσονται κατά μήκος της βασικής μεμβράνης και έχουν σαν ρόλο την στήριξη και τη θρέψη των αναπτυσσόμενων σπερματοζωαρίων. Το συνολικό μήκος των 600 έως 1200 σπερματικών σωληναρίων στον ανθρώπινο όρχι εκτιμάται στα 250 μέτρα (119, 121). Τα ευθεία σπερματικά σωληνάρια στο μεσαύλιο συνενώνονται μεταξύ τους και σχηματίζουν το ορχικό δίκτυο του Haller (Rete Testis), από όπου ξεκινούν 15-20 εκφορητικοί πόροι που εκβάλλουν στην κεφαλή της επιδιδυμίδας.

Η αρτηριακή παροχή στους όρχεις και την επιδιδυμίδα προέρχεται από τρεις πηγές: την ορχική αρτηρία, την αρτηρία του σπερματικού πόρου και την κρεμαστήρια αρτηρία. Η ορχική αρτηρία προέρχεται από την κοιλιακή αορτή και βρίσκεται σε στενή σχέση με το σπερματικό φλεβικό δίκτυο (ελικοειδές πλέγμα). Η διάταξη των αγγείων εντός του ελικοειδούς πλέγματος, με την παράλληλη διάταξη της ορχικής αρτηρίας και φλεβών οδηγεί στην δημιουργία αντιρρούματος. Η αντιρροή αυτή, διευκολύνει την ανταλλαγή θερμότητας και μικρών μορίων. Αυτές οι δύο ομάδες φλεβών ενώνονται μεταξύ τους και μαζί με τις φλέβες του σπερματικού πόρου σχηματίζουν το ορχικό φλεβικό δίκτυο (ελικοειδές πλέγμα). Οι φλέβες του ελικοειδούς πλέγματος έχουν λεπτό τοίχωμα και πιθανότατα συμβάλλουν στην παθητική διάχυση της τεστοστερόνης και της θερμότητας με την ορχική αρτηρία που είναι σε στενή επαφή.

Μέσα στον σπερματικό τόνο παρατηρούνται λεμφαγγεία (43). Η απόφραξη αυτών των λεμφαγγείων οδηγεί σε διάταση του μεσορχίου αλλά όχι των σπερματικών σωληναρίων, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο διάμεσος χώρος αποχετεύεται από λεμφαγγεία, αλλά τα σπερματικά σωληνάρια όχι. Η λεμφική απόφραξη μπορεί επίσης να οδηγήσει στην εμφάνιση υδροκήλης, μια γνωστή επιπλοκή της αποκατάστασης της κισσοκήλης και της βουβονοκήλης. Το ενδοσωληναριακό υγρό που περιέχει σπερματοζωάρια μεταφέρεται από τα σπερματικά σωληνάρια στο ορχικό δίκτυο και εν

συνεχία στην κεφαλή της επιδιδυμίδας. Αυτό το υγρό που είναι ισοσμωτικό με το πλάσμα, πιστεύεται ότι προέρχεται κυρίως από τα σπερματικά σωληνάκια. Η επαναπορρόφηση αυτού του υγρού από το ορχικό δίκτυο και τα απαγωγά σωληνάκια ρυθμίζεται από τα οιστρογόνα (44). Η σύνθεση του ενδοσωληνιακού υγρού διαφέρει σημαντικά από αυτή του πλάσματος και της λέμφου. Αυτό υποδηλώνει ότι οι ουσίες δεν μπορούν να διαχέονται ελεύθερα μέσα και έξω από τα σπερματικά σωληνάκια (45).

Οι όρχεις είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή των σπερματοζωαρίων και των ανδρογόνων, διαδικασίες γνωστές ως σπερματογένεση και στεροειδογένεση αντίστοιχα. Αυτές οι δύο ξεχωριστές διαδικασίες λαμβάνουν χώρα σε δύο μορφολογικά και λειτουργικά διαφορετικά διαμερίσματα του όρχι: τα σπερματικά σωληνάκια και το διάμεσο χώρο. Παρόλο που είναι ανατομικά και λειτουργικά διαφορετικά, αυτά τα δύο διαμερίσματα λειτουργούν στενά μεταξύ τους και είναι και τα δύο απαραίτητα για την επίτευξη των σωστών παραμέτρων στην ποιότητα και στην παραγωγή ικανού αριθμού σπέρματοζωαρίων (52).

#### Διάμεσος χώρος

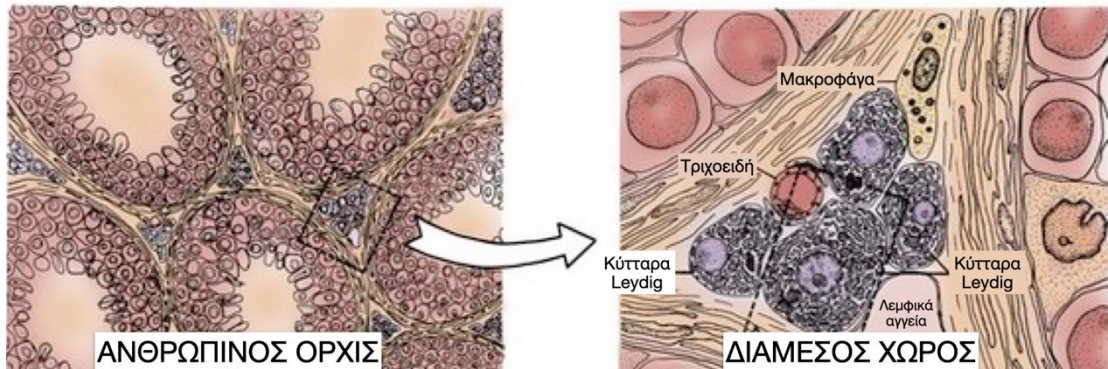
Ο διάμεσος χώρος αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό με αιμοφόρα και λεμφικά αγγεία, ινοβλάστες, νεύρα, μακροφάγα, ιστιοκύτταρα, και κυρίως από τα διάμεσα κύτταρα Leydig (52).

#### *Κύτταρα Leydig.*

Τα κύτταρα Leydig είναι υπεύθυνα για το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής στεροειδών ορμονών των όρχεων. Τα κύτταρα Leydig διαφοροποιούνται από τα πρόδρομα μεσεγχυματικά κύτταρα περίπου την 7η εβδομάδα κύησης. Η ενεργοποίηση της στεροειδογένεσης των κυττάρων Leydig σχετίζεται με την έναρξη της διαφοροποίησης του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος που εξαρτάται από τα ανδρογόνα. Τα κύτταρα Leydig διαφοροποιούνται από τα μεσεγχυματικά κύτταρα υπό την επίδραση της LH και της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG) που εκκρίνεται από τον πλακούντα και από την επίδραση τοπικών παρακρινικών παραγόντων όπως ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας-1 (IGF-1) (122-124).

Στον 2 έως 3 μήνα μετά τη γέννηση, εμφανίζεται ένα δεύτερο κύμα διαφοροποίησης των κυττάρων Leydig ως απάντηση στην παραγωγή γοναδοτροπίνων της υπόφυσης,

αυξάνοντας εν συντομία τα επίπεδα τεστοστερόνης. Μετά την επανενεργοποίηση του άξονα HPG κατά την εφηβεία, η στερεολογική εκτίμηση αποκάλυψε ότι ένας μόνο όρχις από έναν νεαρό ενήλικα περιέχει περίπου 700 εκατομμύρια κύτταρα Leydig (125).



Εικόνα 9. Μικροσκοπική εικόνα του διάμεσου χώρου του όρχεως.

### Τεστοστερόνη

Η τεστοστερόνη, που συντίθεται από τη χοληστερόλη, είναι το κύριο στεροειδές που παράγεται από τους όρχις. Παράγονται επίσης πολλά στεροειδή C18, C19 και C21. Η χοληστερόλη πρέπει να μεταφερθεί στα μιτοχόνδρια των κυττάρων Leydig, όπου το ένζυμο διάσπασης της πλευρικής αλυσίδας της χοληστερόλης τη μετατρέπει σε πρεγνενολόνη. Οι τρεις κύριες πηγές χοληστερόλης στο κύτταρο Leydig είναι (1) εξωγενής από τη διατροφή όπου λιποπρωτεΐνες που κυκλοφορούν στα αιμοφόρα αγγεία και στη συνέχεια μέσω εσωτερίκευσης του συμπλέγματος υποδοχέα χοληστερόλης-λιποπρωτεΐνης, (2) από τη de novo σύνθεση της από οξικό και (3) από αποθηκευμένες εστέρες χοληστερόλης στα λιποσταγονίδια. Η συντήρηση των αποθεμάτων χοληστερόλης αποτελεί μέρος της φυσιολογικής λειτουργίας των κυττάρων Leydig. Η διέγερση των κυττάρων Leydig από την LH προκαλεί την κινητοποίηση της χοληστερόλης μέσω της δραστηριότητας της εστεράσης χοληστερόλης. Η πρεγνενολόνη μεταφέρεται από τη μιτοχονδριακή μεμβράνη στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου μετατρέπεται σε τεστοστερόνη. Η τεστοστερόνη απελευθερώνεται αμέσως στην κυκλοφορία μετά την παραγωγή και συνδέεται με πρωτεΐνες μεταφοράς που είναι ειδικές δεσμευτικές για τα στεροειδή (126).

Η μεταφορά χοληστερόλης στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων ρυθμίζεται από δύο πρωτεΐνες μεταφοράς: την οξεία ρυθμιστική πρωτεΐνη της στεροειδογένεσης (StAR) και τον περιφερικό υποδοχέα βενζοδιαζεπίνης (PBR). Η

δέσμευση της LH προκαλεί τη σύνθεση της StAR στα κύτταρα Leydig, η οποία στη συνέχεια μεταφέρει τη χοληστερόλη από την εξωτερική στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (127, 128).

Ο PBR σχηματίζει έναν διαυλο για την χοληστερόλη στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (129), αλλά δεν είναι σαφές εάν το PBR αλληλεπιδρά λειτουργικά με το StAR (130). Τα τέσσερα κύρια ένζυμα που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση τεστοστερόνης από πρεγνενολόνη είναι το ένζυμο διάσπασης πλευρικής αλυσίδας χοληστερόλης, η 3β-υδροξυστεροειδής αφυδρογονάση, η 17α-υδροξυλάση/17-20-λυάση του κυτοχρώματος P450 και η 17β-υδροξυστεροειδής αφυδρογονάση. Οι μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν αυτά τα ένζυμα προκαλούν διαταραχές στη βιοσύνθεση των ορμονικών ανδρογόνων και είναι μια σχετικά σπάνια αιτία ασαφούς σεξουαλικού προσανατολισμού σε άνδρες με φυσιολογικά χρωμοσώματα (131).

Έλεγχος της σύνθεσης τεστοστερόνης.

Ο έλεγχος της στεροειδογένεσης των κυττάρων Leydig είναι πολύπλοκος και περιλαμβάνει τόσο την υπόφυση όσο και μη υποφυσιακούς παράγοντες (132). Ο πιο σημαντικός ρυθμιστής της παραγωγής τεστοστερόνης είναι η LH. Μετά τη σύνδεση της LH, μέσω του cAMP, τα κύτταρα Leydig ξεκινούν τη μεταφορά της χοληστερόλης στα μιτοχόνδρια. Πεπτίδια της υπόφυσης εκτός από την LH (π.χ. FSH και προλακτίνη) τροποποιούν την απόκριση στην LH. Άλλοι, μη υποφυσιακοί παράγοντες που μπορούν να τροποποιήσουν την παραγωγή στεροειδών ορμονών από τα κύτταρα Leydig περιλαμβάνουν την GnRH, την ινχιπίνη και την ακτιβίνη, τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF), IGF-1 και TGF-β, τις προσταγλανδίνες και την αδρενεργική διέγερση (133, 134). Επιπλέον, η άμεση αναστολή της στεροειδογένεσης των κυττάρων Leydig μπορεί να συμβεί μέσω της δράσης των οιστρογόνων και των ανδρογόνων (135).

Κύκλοι τεστοστερόνης.

Τα επίπεδα της τεστοστερόνης στο αίμα αλλάζουν δραματικά κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης εμβρυϊκής, νεογνικής και ενήλικης ζωής. Η κορύφωση της τεστοστερόνης εμφανίζεται στο ανθρώπινο έμβryo την 12η έως 18η εβδομάδα κύησης. Μια άλλη αιχμή της τεστοστερόνης εμφανίζεται στην ηλικία περίπου των 2 μηνών (μίνι-εφηβεία). Μια τρίτη κορύφωση της τεστοστερόνης εμφανίζεται κατά τη δεύτερη ή τρίτη δεκαετία

της ζωής. Μετά, υπάρχει μια σταθεροποίηση και στη συνέχεια μια αργή πτώση με την πάροδο της ηλικίας. Σε αυτήν την περίπτωση, υπάρχουν ετήσιοι και ημερήσιοι ρυθμοί παραγωγής τεστοστερόνης και ακανόνιστες ημερήσιες διακυμάνσεις στην τεστοστερόνη. Αυτές οι χρονικές αλλαγές στην παραγωγή τεστοστερόνης κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης ζωής αντανακλούν μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ της υπόφυσης και των όρχεων. Τα επίπεδα της τεστοστερόνης στα στάδια κορύφωσης αντιστοιχούν χρονικά σε τέσσερα αναπτυξιακά γεγονότα: (1) τη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη του εμβρυϊκού αναπαραγωγικού συστήματος, (2) τη νεογνική οργάνωση ή «αποτύπωση» ανδρογονοεξαρτώμενων ιστών-στόχων, (3) την εμφάνιση των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου στον άνδρα κατά την εφηβεία και (4) την διατήρηση της ανάπτυξης και της λειτουργίας των ανδρογονοεξαρτώμενων οργάνων στον ενήλικα (54, 126, 136).

#### Σπερματικά σωληνάρια

Κάθε σπερματικό σωληνάριο αποτελείται από γεννητικά και στηρικτικά κύτταρα. Το σύνολο των σπερματικών σωληναρίων είναι το μοναδικό περιβάλλον για την παραγωγή σπερματοζωαρίων. Τα στηρικτικά κύτταρα περιλαμβάνουν τα κύτταρα Sertoli, τα ινοκύτταρα και τα μυοειδή κύτταρα της βασικής μεμβράνης. Το σπερματικό επιθήλιο, το οποίο αποτελείται από γεννητικά κύτταρα σε διάφορα στάδια σπερματογένεσης και σπερμιογένεσης (52).

*Κύτταρα Sertoli.* Τα κύτταρα Sertoli είναι κυλινδρικά, μη διαιρούμενα επιθηλιακά κύτταρα που στηρίζονται στη βασική μεμβράνη του σπερματικού σωληναρίου. Το άφθονο κυτταρόπλασμα τους επεκτείνεται μέχρι τον αυλό και αποτελείται από δεσμίδες ινιδίων (κρυσταλλοειδή Charcot-Bottcher) και προεκβολές οι οποίες περιβάλλουν τα γεννητικά κύτταρα. Προς τον αυλό του σπερματικού σωληναρίου στρέφεται η κορυφή του κυττάρου Sertoli όπου εφάπτονται οι ώριμες σπερματίδες. Τα κύτταρα Sertoli χαρακτηρίζονται από μεγάλο ωοειδή πυρήνα ο οποίος σχηματίζει ορθή γωνία με τη βασική μεμβράνη, με διάχυτη χρωματίνη και προβάλλον κεντρικό πυρήνιο (52).

Τα κύτταρα Sertoli συνδέονται μεταξύ τους με εκτεταμένες στενές συνάψεις σχηματίζοντας συναπτικά συμπλέγματα (137). Τα συναπτικά αυτά συμπλέγματα διαιρούν το σπερματικό σωληνάριο σε βασικό και αυλικό διαμέρισμα και εμποδίζουν τη δίοδο ουσιών μεταξύ των δύο αυτών διαμερισμάτων μέσω ενός αιματοορχικού φραγμού. Το



βασικό διαμέρισμα περιλαμβάνει το μεσοκυττάριο διάστημα και τους χώρους που καταλαμβάνονται από τα σπερματογόνια και νεαρά σπερματοκύτταρα. Το αυλικό διαμέρισμα περιλαμβάνει τον αυλό των σωληναρίων και τα μεσοκυττάρια διαστήματα μέχρι το επίπεδο των συναπτικών συμπλεγμάτων. Στο διαμέρισμα αυτό υπάρχουν ώριμα σπερματοκύτταρα και σπερματίδες (52).

Ο αιματοορχικός φραγμός δημιουργεί ένα ιδανικό μικροπεριβάλλον για τη σπερματογένεση προστατεύοντας τα γεννητικά κύτταρα από βλαπτικούς ή τοξικούς παράγοντες που μεταφέρονται με τη συστηματική κυκλοφορία και παρεμποδίζει την ανάπτυξη αντισπερμικών αντισωμάτων (138).

Τα κύτταρα Sertoli προσφέρουν θρεπτική και στηρικτική υποστήριξη για την εξέλιξη των κυττάρων του σπερματικού επιθηλίου. Οι αποφρακτικές συνάψεις μεταξύ των κυττάρων Sertoli αναδιαμορφώνονται συνεχώς για να επιτρέψουν το «άνοιγμα» και το «κλείσιμο» απαραίτητο για την αλληλεπίδραση και τη μετανάστευση των γεννητικών κυττάρων (137). Επίσης τα κύτταρα Sertoli είναι υπεύθυνα για την ανταλλαγή μεταβολιτών με τη συστηματική κυκλοφορία. Μέσω των αποφρακτικών συνάψεων τα κύτταρα Sertoli ρυθμίζουν το εσωτερικό περιβάλλον του σπερματικού σωληναρίου. Τα κύτταρα Sertoli παρέχουν ανοσολογικό άσυλο στους όρχεις, διατηρώντας με τις αποφρακτικές συνάψεις ένα μικροπεριβάλλον γεννητικών κυττάρων αυστηρά οριοθετημένο και αποκλεισμένο από τον εξωσωληνιαρικό κόσμο (139).

Υπό την επίδραση της FSH τα κύτταρα Sertoli εκκρίνουν την πρωτεΐνη που δεσμεύει τα ανδρογόνα (ABP) (140). Η ABP είναι ένας ενδοκυττάριος μεταφορέας ανδρογόνων μέσα στα κύτταρα Sertoli. Η ABP εξασφαλίζει μία υψηλή συγκέντρωση ανδρογόνων (50 φορές υψηλότερα από τον ορό) εντός των σπερματικών σωληναρίων, όπου τα ανδρογόνα διεγείρουν τη σπερματογένεση. Η τεστοστερόνη παίζει επίσης καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας των κυττάρων Sertoli, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής ABP. Η ινχιμπίνη Β παράγεται από τα κύτταρα Sertoli και παίζει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην αρνητική παλίνδρομη ρύθμισης της έκκρισης FSH (141, 142). Η ινχιμπίνη Β θεωρείται ως ένας σημαντικός ενδοκρινικός δείκτης της λειτουργίας των κυττάρων Sertoli στην αξιολόγηση της ανδρικής υπογονιμότητας (143).

Τα κύτταρα Sertoli εκκρίνουν κι άλλους σημαντικούς παράγοντες όπως είναι τα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας (λαμινίνη, κολλαγόνο τύπου IV και κολλαγόνο τύπου I) και πρωτεΐνες όπως η σερουλοπλασμίνη, η τρανσφερίνη, η γλυκοπρωτεΐνη 2, ο

ενεργοποιητής πλασμινογόνου, και ουσίες τύπου σωματομεδίνης όπως T πρωτεΐνες, H-Y αντιγόνα, κλαστερίνη, κυκλικές πρωτεΐνες, αυξητικούς παράγοντες και σωματομεδίνη (137).

Συνοπτικά, τα κύτταρα Sertoli έχουν σαν λειτουργία: (1) τη στήριξη, δομική και μεταβολική των αναπτυσσόμενων γεννητικών κυττάρων, (2) τη θρέψη αυτών παρέχοντας θρεπτικά συστατικά και παράγοντες ανάπτυξης, (3) την προστασία αυτών μέσω της δημιουργίας του αιματοορχικού φραγμού απομονώνοντας τα από το ανοσοποιητικό σύστημα, (4) τη φαγοκυττάρωση υπολειμματικών σωματίων (σπερμιογένεση) και εκφυλισμένων σπερματογόνων κυττάρων, (5) την ελευθέρωση των σπερματοζωαρίων στον αυλό των σπερματικών σωληναρίων (σπερμίαση), (6) την έκκριση υγρού και ιόντων στον αυλό των σπερματικών σωληναρίων για τη μεταφορά των σπερματοζωαρίων, (7) την παραγωγή ορμονών με ενδοκρινική, παρακρινική και αυτοκρινική δράση (52).

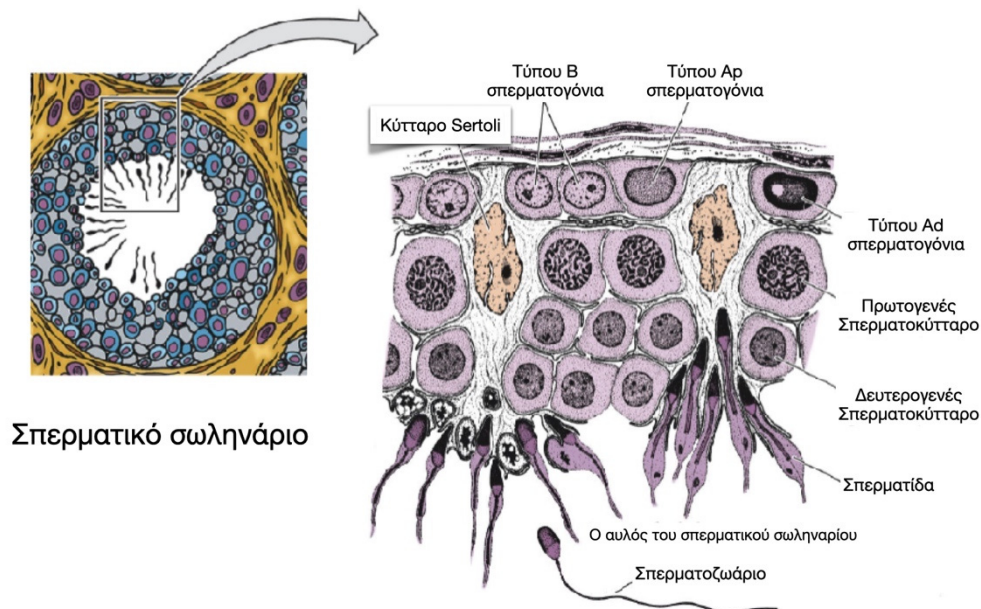
Οι κύριες ουσίες που εκκρίνονται από τα κύτταρα Sertoli είναι:

1. Αντιμυλλέριος ορμόνη (MIS) – εκκρίνεται στα αρχικά στάδια της εμβρυικής ζωής
2. Ινχιμπίνη και ακτιβίνη – εκκρίνονται μετά την εφηβεία και συμμετέχουν στην ρύθμιση της έκκρισης της FSH
3. Δεσμευτική πρωτεΐνη των ανδρογόνων (ABP) – μεταφέρει την τεστοστερόνη στα σπερματικά σωληνάκια και στην κεφαλή της επιδιδυμίδας
4. Οιστραδιόλη – μέσω της αρωματάσης των κυττάρων Sertoli μετατρέπεται η τεστοστερόνη σε 17-β οιστραδιόλη
5. Συντελεστή μεταγραφής ERM – απαιτείται για την αυτοανανέωση των βλαστικών γεννητικών κυττάρων
6. Τρανσφερίνη – μία πρωτεΐνη μεταφοράς ιόντων σιδήρου (144).

#### Γεννητικά κύτταρα

Εντός του ανθρώπινου σπερματικού σωληναρίου, τα γεννητικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε περίπου  $123 \times 10^6$  (εύρος, 21 έως  $374 \times 10^6$ ) σπερματοζωάρια καθημερινά. Αυτό ισοδυναμεί με την παραγωγή περίπου 1000 σπερματοζωαρίων ανά καρδιακό παλμό. Κάθε σπερματικό σωληνάριο περιέχει γενετικά κύτταρα σε διαφορετικό στάδιο διαφοροποίησης. Η μορφολογική ανάλυση των γεννητικών κυττάρων αποκαλύπτει τουλάχιστον 13

διαφορετικούς τύπους γεννητικών κυττάρων στον ανθρώπινο όρχι. Κάθε τύπος κυττάρου θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει ένα διαφορετικό στάδιο στη σπερματογενετική διαδικασία. Προχωρώντας από το λιγότερο στο περισσότερο διαφοροποιημένο, με βάση τη μορφολογική εμφάνιση, έχουν ονομαστεί: τύπου A βαθυχρωματικά σπερματογόνια (Ad), τύπου A αραιοχρωματικά σπερματογόνια (Ap), τύπου B σπερματογόνια (B), πρωτογενή σπερματοκύτταρα στη φάση της προ-λεπτοταινίας (R), της λεπτοταινίας (L), της ζυγοτενίας (Z), και της παχυτενίας (P), δευτερογενή σπερματοκύτταρα (II) και σπερματίδες Sa, Sb, Sc, Sd1 και Sd2. Οι αποφρακτικές συνάψεις των κυττάρων Sertoli διατηρούν τα σπερματογόνια και τα πρώιμα σπερματοκύτταρα στο βασικό διαμέρισμα και τα υπόλοιπα γεννητικά κύτταρα στο αυλικό διαμέρισμα (145).



**Εικόνα 10.** Μικροσκοπική απεικόνιση του αυλού ενός σπερματικού σωληναρίου.

[Τροποποιημένη αναφορά από Dym 1977, The male reproductive system. In L. Weiss and R. o. Greep (eds.), Histology, 4<sup>th</sup> Ed. McGraw-Hill, New York, pp. 979-1038.] (146).

### Περισωληναριακή δομή

Τα ανθρώπινα σπερματικά σωληνάκια περιβάλλονται από πολλά στρώματα περισωληναριακών ιστών (147). Ο εξωτερικός χιτώνας αποτελείται από ινοκύτταρα. Στο μεσαίο χιτώνα υπάρχουν διάσπαρτα μυοειδή κύτταρα με ελάσματα συνδετικού ιστού. Ο εσωτερικός χιτώνας αποτελείται από κολλαγόνο. Στον άνθρωπο τα περισωληναριακά μυοειδή κύτταρα θεωρείται ότι έχουν συσταλτική λειτουργία και είναι υπεύθυνα για την

προώθηση των ακίνητων σπερματοζωαρίων (148). Τα περισωληναριακά μυοειδή κύτταρα εκκρίνουν ενεργά συστατικά εξωκυττάριας ουσίας όπως την ιονηκτίνη και το κολλαγόνο τύπου I για τη δημιουργία του εσωτερικού χιτώνα (149). Τα μυοειδή κύτταρα μπορεί επίσης να επηρεάσουν τη λειτουργία των κυττάρων Sertoli και από μερικές μελέτες θεωρείται ότι συμβαλλουν κι αυτά στη δημιουργία του αιματοορχικού φραγμού. Επίσης παρουσιάζουν παρακρινή δράση μέσω της παραγωγής παραγόντων που συμμετέχουν ενεργά στις διαδικασίες εντός των σπερματικών σωληναρίων όπως την ακτιβίνη A και τον αιμοπεταλιακό αυξητικό παράγοντα (platelet derived growth factor). Ο Skinner και οι συνεργάτες (1988) απομόνωσαν έναν παράγοντα με παρακρινή δράση που παράγεται από τα μυοειδή κύτταρα, τον P-Mod-S (peritubular modify Sertoli), που ρυθμίζει τη λειτουργία των κυττάρων Sertoli in vitro (150). Τα μυοειδή κύτταρα προάγουν την ίωση στις περιπτώσεις που απουσιάζει η σπερματογένεση (151).

#### Αιματοορχικός φραγμός

Οι χρωστικές και άλλες ουσίες, όταν εγγέονται στην κυκλοφορία του αίματος των ζώων, θα εμφανιστούν γρήγορα σε όλους τους ιστούς του σώματος αλλά δεν θα διεισδύσουν στις περιοχές του εγκεφάλου και των όρχεων. Αυτό οδήγησε στην έννοια της ύπαρξης ενός αιματοορχικού φραγμού. Ο αιματοορχικός φραγμός έχει δύο στοιχεία, ένα ανατομικό ή μηχανικό στοιχείο και ένα λειτουργικό στοιχείο. Ο μηχανικός φραγμός δημιουργείται, εν μέρει, από τα μυοειδή κύτταρα που μοιάζουν με μυς που περιβάλλουν τα σπερματικά σωληνάκια (152). Η ρύθμιση της μοριακής κυκλοφορίας συμβαίνει επίσης στο επίπεδο των τριχοειδών ενδοθηλιακών κυττάρων. Ωστόσο, το πιο σημαντικό συστατικό αυτού του φραγμού είναι οι ισχυρές διακυττάριας συνδέσεις μεταξύ κυττάρων Sertoli που αποκλείουν τη διέλευση μεγάλων μορίων και λεμφοκυττάρων (153).

Το ανατομικό στοιχείο του αιματοορχικού φραγμού είναι απαραίτητο αλλά δεν επαρκεί για τη διατήρηση της ανοσολογικής προστασίας εντός των σπερματικών σωληναρίων, επειδή δεν παρατηρείται και σε άλλες προστατευόμενες περιοχές της αναπαραγωγικής οδού (154, 155). Έτσι, αν και ο μηχανικός φραγμός συμβάλλει στην απομόνωση των όρχεων, θεωρείται απαραίτητο να υπάρχουν και άλλα «λειτουργικά» στοιχεία για την καταστολή της φυσιολογικής ανοσολογικής απάντησης. Πολλοί μηχανισμοί συνεργάζονται για να προστατεύσουν το σπέρμα από την καταστροφή. Ο Tung και οι συνεργάτες του έχουν προτείνει, ότι εντός των ανατομικά ευάλωτων περιοχών

του αιματοορχικού φραγμού (ορχικό δίκτυο, απαγωγά σωληνάκια, επιδιδυμίδα) υπάρχει μια μικρή, συνεχής διαρροή αντιγόνων σπέρματος (156). Αυτή η διαρροή δημιουργεί κατασταλτικά T-λεμφοκύτταρα και ανοσολογική ανοχή, παρόμοια με τα πρωτόκολλα απευαισθητοποίησης για κοινά περιβαλλοντικά αλλεργιογόνα. Ωστόσο, με μεγαλύτερες αντιγονικές προκλήσεις, προκύπτει μια πραγματική ανοσολογική απάντηση. Οι κυτοκίνες μπορούν να συμβάλλουν στην ανοσολογική ανοχή, συμπεριλαμβανομένης της ιντερφερόνης- $\gamma$ , του διαλυτού υποδοχέα Fc και του TGF- $\beta$  (157). Επιπλέον, τα ανδρογόνα έχουν ήπια ανοσοκατασταλτική δράση και μπορεί να ρυθμίζουν την ανοσία (158).

Γιατί υπάρχει ο αιματοορχικός φραγμός;

Ο αιματο-ορχικός φραγμός είναι ιδιαίτερα σημαντικός για την σπερματογένεση καθώς επιτελεί πολλές λειτουργίες που την προστατεύουν. Αναπτύσσεται κατά την σπερμαρχή και είναι πιθανότατα σημαντικός για την μειωτική διαίρεση. Εμποδίζει εκλεκτικά τη δίοδο ιόντων, ηλεκτρολυτών, νερού, ορμονών και ουσιών με παρακρινή δράση. Ο αιματοορχικός φραγμός είναι υπεύθυνος για τη δημιουργία πολικότητας στα κύτταρα του όρχι, καθώς διαφορετικές ουσίες εκκρίνονται προς το διάμεσο χώρο, προς τα βλαστικά κύτταρα και προς τον αυλό των σπερματικών σωληναρίων. Επιπλέον, μπορεί να απομονώσει, σε ένα ανοσολογικά προστατευόμενο μικροπεριβάλλον, τα αναπτυσσόμενα γαμετικά κύτταρα που αναγνωρίζονται ως εισβολής από το ανοσοποιητικό σύστημα. Με αυτό τον τρόπο αποτρέπεται η παραγωγή αντι-σπερμικών αντισωμάτων. Υπό την έννοια αυτή, η αξία του αιματοορχικού φραγμού ολοκληρώνεται πλήρως μετά την εφηβεία, επειδή τα «ξένα αντιγόνα» στα μεταμειωτικά γεννητικά κύτταρα υπάρχουν μόνο μετά τη σπερμαρχή. Μετά από βιοψία, συστροφή ή τραύμα όρχεως που θα συμβεί πριν από την εφηβεία, δεν παρατηρείται η παραγωγή αντισπερμικών αντισωμάτων. Ωστόσο, μετά την εφηβεία, η υπογονιμότητα ανοσολογικής αιτιολογίας είναι ένας υπαρκτός κίνδυνος. Κλινικά, ο αιματοορχικός φραγμός μπορεί να περιορίσει την προσβασιμότητα της χημειοθεραπείας στα καρκινικά κύτταρα που έχουν παγιδευτεί πίσω του και να οδηγήσει σε υποτροπή της νόσου εντός των όρχεων (139, 159, 160).



## Σπερματογένεση

Η σπερματογένεση είναι μια περίπλοκη και εξειδικευμένη διαδικασία που περιλαμβάνει κυτταρικές διαιρέσεις και διαφοροποιήσεις και οδηγεί στο σχηματισμό ώριμων γεννητικών κυττάρων του άνδρα (σπερματοζωάρια) από πρόδρομες μορφές (σπερματογόνια). Σε παλαιότερες μελέτες έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η διαδικασία της σπερματογένεσης στον άνθρωπο διαρκεί περίπου 64 ημέρες (161). Ωστόσο, μία *in vivo* κινητική μελέτη σε υγιείς άνδρες αποκάλυψε ότι ο συνολικός χρόνος για την παραγωγή των σπερματοζωαρίων κυμαίνεται από 42 έως 76 ημέρες, υποδηλώνοντας ότι η διάρκεια της σπερματογένεσης μπορεί να ποικίλλει ευρέως μεταξύ ατόμων (162).

Ένας κύκλος σπερματογένεσης περιλαμβάνει τη διαίρεση των αρχέγονων βλαστικών γεννητικών κυττάρων σε διαδοχικές γενεές γεννητικών κυττάρων. Αρκετοί κύκλοι σπερματογένεσης συνυπάρχουν ταυτόχρονα στο σπερματικό επιθήλιο, και περιγράφονται μορφολογικά ως στάδια. Ο κύκλος της σπερματογένεσης περιλαμβάνει τη διαδοχική χρονικά εμφάνιση όλων των σταδίων της σπερματογένεσης. Σε κάθε κύκλο στον άνθρωπο διακρίνονται 6 στάδια (163). Επιπλέον, υπάρχει μια συγκεκριμένη οργάνωση του κύκλου της σπερματογένεσης στο χώρο του σπερματικού σωληναρίου, που ονομάζεται σπερματογενετικό κύμα. Το κύμα της σπερματογένεσης περιλαμβάνει τη διαδοχική εμφάνιση όλων των σταδίων της σπερματογένεσης κατά μήκος του σπερματικού σωληναρίου. Στοιχεία από μελέτες δείχνουν ότι η ανθρώπινη σπερματογένεση πραγματοποιείται σε μια σπειροειδή ή ελικοειδή κυτταρική διάταξη η οποία διασφαλίζει ότι η παραγωγή σπερματοζωαρίων είναι μια συνεχής και όχι παλμική διαδικασία (164).

Η σπερματογένεση ξεκινάει από την εμβρυική ζωή με την διαίρεση των σπερματογονίων σε θυγατρικά κύτταρα που μπορεί να είναι σπερματογόνια ή πρωτογενή σπερματοκύτταρα. Η διαδικασία της σπερματογένεσης αναστέλλεται σε αυτό το στάδιο και επανενεργοποιείται ξανά στην εφηβεία όπου και συνεχίζει για την υπόλοιπη ζωή. Η σπερματογένεση διακρίνεται σε τρεις φάσεις: (1) την πολλαπλασιαστική φάση στην οποία τα σπερματογόνια διαιρούνται μιτωτικά για να διατηρήσουν τον αριθμό τους (αυτοανανέωση) ή διαφοροποιούνται σε θυγατρικά κύτταρα που θα εξελιχθούν σε ώριμους γαμέτες, (2) την μειωτική φάση στην οποία τα γεννητικά κύτταρα υποβάλλονται σε μειωτική διαίρεση, με αποτέλεσμα την δημιουργία απλοειδών σπερματίδων και (3) την φάση της σπερμιογένεσης στην οποία οι σπερματίδες διαφοροποιούνται σε ώριμα σπερματοζωάρια χωρίς περαιτέρω διαίρεση (165, 166).

### Πολλαπλασιαστική φάση

Στην πρώτη φάση της σπερματογένεσης τα σπερματογόνια πολλαπλασιάζονται με μιτωτικές διαιρέσεις για να αυξήσουν τον αριθμό τους ή για να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα που θα μετατραπούν σε ώριμους γαμέτες. Τα σπερματογόνια είναι διπλοειδικά κύτταρα που καταλαμβάνουν τη βασική μεμβράνη του σπερματικού επιθηλίου και τα οποία βάσει της χρώσης του πυρήνα διακρίνονται σε τρεις λειτουργικά διαφορετικούς τύπους σπερματογονίων: τα βαθυχρωματικά σπερματογόνια τύπου Ad, τα αραιοχρωματικά σπερματογόνια τύπου Ap και τα σπερματογόνια τύπου B.

Τα σπερματογόνια Ad αποτελούν μια δεξαμενή βλαστικών κυττάρων τα οποία υπό κανονικές συνθήκες είναι μιτωτικώς ανενεργά και δεν αποτελούν την πηγή των σπερματογονίων Ap. Τα σπερματογόνια τύπου Ap διαιρούνται μιτωτικά είτε προς δύο σπερματογόνια Ap (ανανέωση του πληθυσμού) είτε προς σπερματογόνια τύπου B. Στον άνθρωπο η χρονική διάρκεια της διαφοροποίησης των σπερματογονίων Ap σε σπερματογόνια τύπου B είναι 16 ημέρες (161). Τα σπερματογόνια τύπου B αποτελούν τον καθοριστικό παράγοντα ποσοτικής παραγωγής σπερματοζωαρίων. Στη συνέχεια δημιουργούνται τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα (I) από την τελευταία μιτωτική διαίρεση των σπερματογονίων τύπου B.

Μετά τη μίτωση, τα μητρικά και θυγατρικά κύτταρα συνδέονται μεταξύ τους με κυτταροπλασματικές γέφυρες λόγω ατελούς κυτταροκίνησης. Οι κυτταροπλασματικές γέφυρες παρατηρούνται μεταξύ των γεννητικών κυττάρων όλων των τάξεων και σε όλη τη διάρκεια της σπερματογένεσης (167). Οι κυτταροπλασματικές γέφυρες παίζουν σημαντικό ρόλο στον συγχρονισμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση και στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

### Μειωτική φάση

Η δεύτερη φάση της σπερματογένεσης λαμβάνει χώρα όταν τα προλεπτοταινικά πρωτογενή σπερματοκύτταρα (θυγατρικά κύτταρα των σπερματογονίων τύπου B) αρχίζουν να μεταναστεύουν προς τον αυλό του σπερματικού σωληναρίου και παράλληλα διπλασιάζουν το DNA τους (φάση S κυτταρικού τους κύκλου) (2n, 4c) για να εισέλθουν στην πρώτη μειωτική διαίρεση (166).



Με την έναρξη της εφηβείας δίνεται το ερέθισμα για την έναρξη της πρώτης μειωτικής διαίρεσης. Στη φάση αυτή τα προλεπτοταινικά πρωτογενή σπερματοκύτταρα υφίστανται μια διαδικασία αύξησης και ωριμανσης.

Συγκεκριμένα στην πρόφαση I διακρίνουμε πρωτογενή σπερματοκύτταρα στο:

- στάδιο της λεπτοταινίας, όπου το χρωμόσωμα κάθε αδελφής χρωματίδας αρχίζει να συσπειρώνεται
- στάδιο της ζυγοταινίας, όπου συνάπτονται τα ομόλογα χρωμοσώματα
- στάδιο της παχυταινίας, όπου μεταξύ των ομόλογων χρωμοσωμάτων πραγματοποιείται ανταλλαγή γενετικού υλικού.

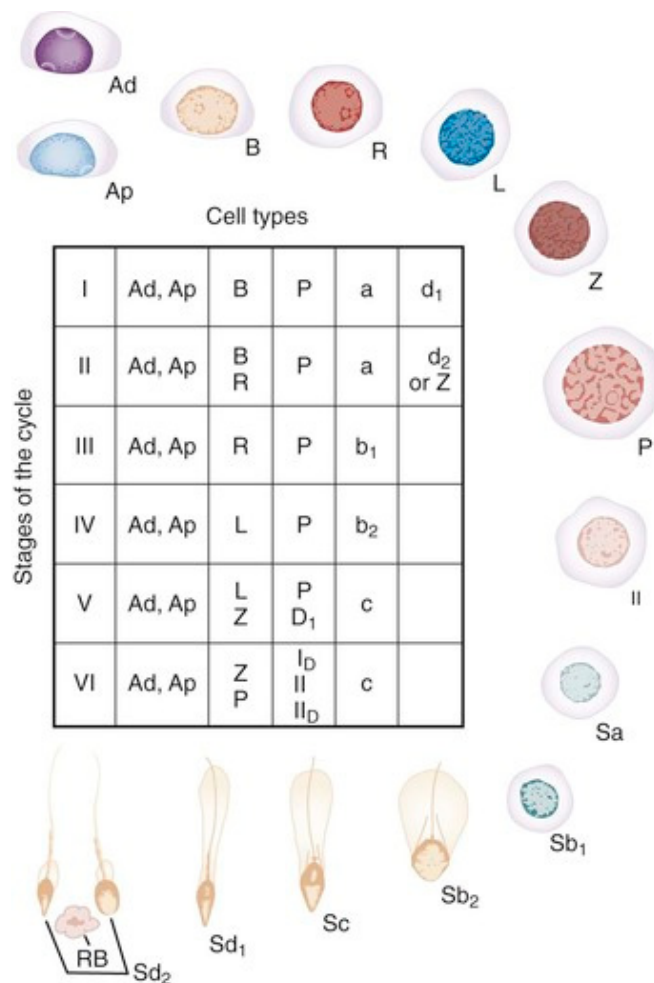
Μετά την πρόφαση I ακολουθεί η μετάφαση, ανάφαση και στην τελόφαση I προκύπτουν τα θυγατρικά κύτταρα που ονομάζονται δευτερογενή σπερματοκύτταρα (II) τα οποία περιέχουν απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων.

Τα δευτερογενή σπερματοκύτταρα είναι μικροτερο, διαρκεια ζωης 6 ώρες, και ξεκινούν τη δεύτερη μειωτική διαίρεση (πρόφαση II) χωρίς διπλασιασμό του DNA τους. Μετά την τελόφαση II προκύπτουν οι ανευπλοειδικές σπερματίδες Sa. Από κάθε αρχικό γεννητικό κύτταρο προκύπτουν τέσσερις σπερματίδες.

Ο χρωμοσωμικός ανασυνδυασμός, το σημαντικότερο γεγονός της φυλετικής αναπαραγωγής, διασφαλίζει ότι ο ανασυνδυασμός των γονιδίων στους απογόνους είναι σε διαφορετικές διατάξεις από εκείνες των γονέων. Το γεγονός αυτό διασφαλίζει ότι οι απόγονοι διαφέρουν γενετικά από τους γονείς τους και είναι η βάση της γενετικής ποικιλομορφίας και εξέλιξης.

Κατά τη διάρκεια της πρόφασης I λαμβάνει χώρα η σύνδεση των ομόλογων χρωμοσωμάτων (μητρικών και πατρικών) τα οποία ανταλλάσσουν τμήματα και γενετικό υλικό. Έρευνες έχουν δείξει ότι δομικές ανωμαλίες και μικροαπαλοιφές μετά τον γενετικό ανασυνδυασμό στα ανθρώπινα γεννητικά κύτταρα του άρρενος μπορεί να προκαλέσουν αζωοσπερμία και ανδρική υπογονιμότητα (168). Σε μια μελέτη, το 10% των ανδρών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία είχε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό μικροαπαλοιφές στον ανασυνδυασμό σε σύγκριση με τους άνδρες με φυσιολογική σπερματογένεση (169). Επιπλέον, μεταξύ ανδρών με σπερματογενετική στάση στη βιοψία όρχεων, παρατηρήθηκε ελαττωματικός ανασυνδυασμός σε περίπου τις μισές περιπτώσεις, παρέχοντας ισχυρές αποδείξεις ότι ελαττωματικός ανασυνδυασμός συνδέεται με μειωμένη παραγωγή σπερματοζωαρίων (169).

Οι παραλλαγές στον ανασυνδυασμό έχουν επίσης επιπτώσεις στην ανευλοειδία του σπέρματος, επειδή οι μεταβολές στη θέση διασταύρωσης είναι παράγοντες κινδύνου για τη μη-διάσπαση των χρωμοσωμάτων. Πράγματι, τα στοιχεία προτείνουν ότι η συσχέτιση ελαττωματικού ανασυνδυασμού και ανευλοειδίας σπέρματος σε αζωοσπερμικούς άνδρες είναι αρκετά ισχυρή για να εξηγήσει τα υψηλά ποσοστά χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε απογόνους που επιτεύχθηκαν με *in vitro* γονιμοποίηση (IVF) και ενδοκυτταροπλασματική ένεση σπερματοζωαρίου (ICSI) (170).



**Εικόνα 11.** Τα διάφορα στάδια της σπερματογένεσης στον άνθρωπο.

Ad: Βαθυχρωματικά σπερματογόνια, Ap: Αραιοχρωματικά σπερματογόνια, B: σπερματογόνια τύπου B, II: δευτερογενές σπερματοκύτταρο, L: σπερματοκύτταρο λεπτοτενίας, P: σπερματοκύτταρο παχυτενίας, R: πρωτογενές σπερματοκύτταρο, Rb: υπολειμματικό σωματίο, Sa, Sb<sub>1</sub>, sb<sub>2</sub>, Sc, sd<sub>1</sub>, Sd<sub>2</sub>: σπερματίδες, Z: σπερματοκύτταρο ζυγοτενίας.

[Τροποποιημένη αναφορά από Clermont Y. Renewal of spermatogonia in man. *Am J Anat* 1966;118:509.] (171).

## Σπερμιογένεση

Στη συνέχεια ακολουθεί η σπερμιογένεση, στην οποία οι στρογγυλές σπερματίδες Sa διαφοροποιούνται σε σπερματοζωάρια. Κατά τη διάρκεια της σπερμιογένεσης δεν πραγματοποιείται κυτταρική διαίρεση αλλά συμβαίνουν σημαντικές αλλαγές στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα της στρογγυλής σπερματίδας. Τα γεγονότα αυτά διακρίνονται σε τέσσερις φάσεις:

- φάση Golgi, στην οποία η στρογγυλή σπερματίδα Sa αποκτάει κεφαλο-ουραία συμμετρία, δημιουργούνται τα προ-ακροσωμιακά κυστίδια στην κεφαλή και παρατηρείται η μετανάστευση του κεντριολίου προς την ουρά της σπερματίδας
- φάση καλύπτρας, στην οποία ξεκινάει η επιμήκυνση της σπερματίδας Sb, δημιουργείται η ακροσωμιακή καλύπτρα και η ανάπτυξη του αξονήματος (μαστιγίου).
- φάση ακροσωμίου, στην οποία συνεχίζεται η επιμήκυνση της σπερματίδας Sc, συγκροτείται το ακροσωμάτιο στην καλύπτρα, παρατηρείται η μετατόπιση της περίσσειας κυτταροπλάσματος ουραία, των μιτοχονδρίων στον αυχένα και η ωρίμανση του αξονήματος. Επίσης ξεκινάει η συμπύκνωση του πυρήνα όπου γίνεται αντικατάσταση των ιστονών με πρωταμίνες πλούσιες σε λυσίνη και αργινίνη (δεν διαμορφώνονται νουκλεοσώματα) και οδηγεί στη διακοπή μεταγραφής γονιδίων.
- φάση ωρίμανσης, στην οποία ολοκληρώνεται η επιμήκυνση της σπερματίδας Sd, αποβάλλεται η περίσσεια του κυτταροπλάσματος, το υπολειμματικό σωματίο (RB) το οποίο φαγοκυτταρώνεται από τα κύτταρα Sertoli (166).

Στη συνέχεια απελευθερώνονται οι ώριμες σπερματίδες μέσω διάσπασης των ειδικών ενδοπλασματικών συνδέσεων με τα κύτταρα Sertoli και ακολουθεί η απελευθέρωση των σπερματοζωαρίων στον αυλό του σπερματικού σωληναρίου. Μέλετες έχουν δείξει ότι η διαδικασία αυτή είναι ορμονοεξαρτώμενη, ρυθμίζεται από τα ανδρογόνα και την FSH και είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στη θερμοκρασία, στις τοξίνες και το οξειδωτικό stress (172, 173).

### Ρύθμιση της σπερματογένεσης

Η φυσιολογική εξέλιξη της σπερματογένεσης καθορίζεται από ορμονικούς παράγοντες (FSH, LH/T), τοπικούς (αυτοκρινικούς-παρακρινικούς) παράγοντες, τη θερμοκρασία και γενετικούς-επιγενετικούς παράγοντες.

#### *Ορμονική ρύθμιση*

Η FSH που παράγεται από την αδενούπόφυση, είναι ο κύριος διεγέρτης του πολλαπλασιασμού και της ωρίμανσης των κυττάρων Sertoli κατά την ανάπτυξη. Επίσης σημαντικό ρόλο έχει στην έναρξη της σπερματογένεσης κατά την εφηβεία και δεδομένα έχουν δείξει ότι σε ένα σημαντικό ποσοστό είναι απαραίτητη για την έναρξη της σπερματογένεσης (174, 175). Αξίζει να αναφερθεί ότι μεταλλάξεις του γονιδίου για την υποομάδα β της FSH προκαλούν στον άνθρωπο αζωοσπερμία (176).

Η FSH δρα στα κύτταρα Sertoli και προάγει τη σύνθεση και έκκριση της ABP η οποία είναι ο ενδοσωληναριακός μεταφορέας της τεστοστερόνης και τη μεταφέρει στα κύτταρα στόχους. Η συγκέντρωση της ενδο-ορχικής τεστοστερόνης είναι περίπου 100 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του πλάσματος και αυτό οφείλεται εν μέρη στην ABP. Επίσης εκκρίνονται και άλλες πρωτεΐνες από τα κύτταρα Sertoli μετά από διέγερση από FSH όπως: τρανσφερίνη, σερουλοπλασμίνη, κλαστερίνη, προσταγλανδίνες, αυξητικοί παράγοντες κλπ.

Η FSH συμβάλλει στην διατήρηση των διακυττάρων συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων Sertoli (36). Επίσης σημαντικός είναι ο ρόλος της ως αντιαποπτωτικός παράγοντας των γεννητικών κυττάρων καθώς αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο τα σπερματογόνια (A<sub>p</sub> και B) και τα σπερματοκύτταρα μέχρι το στάδιο της παχυταινίας, πιθανά και τις στρογγυλές σπερματίδες. Η FSH υποστηρίζει την απελευθέρωση των σπερματοζωαρίων στον αυλό του σπερματικού σωληναρίου (177). Στην ενήλικη ζωή ένας από τους βασικούς ρόλους της FSH είναι η ποσοτική διέγερση φυσιολογικών επιπέδων της σπερματογένεσης (175).

Η καταστολή της FSH ρυθμίζεται μέσω αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης από την ινχιπίνη η οποία παράγεται από τα κύτταρα Sertoli. Σε βαριες βλαβες του σπερματικού επιθηλίου η παραγωγή ινχιπίνης αναστέλλεται από τα κύτταρα Sertoli με αποτέλεσμα η έκκριση της FSH να αυξάνεται δραματικά. Τα αυξημένα επίπεδα της FSH αποτελούν ισχυρό δείκτη μη αναστρέψιμης βλάβης του σπερματικού επιθηλίου.

Η τεστοστερόνη είναι ο κύριος ρυθμιστής της έκκρισης GnRH είτε με άμεση δράση είτε έμμεσα μέσω μεταβολιτών της, την DHT και οιστραδιόλη. Η τεστοστερόνη συνδέεται

με τον ανδρογονικό υποδοχέα (AR) και προάγει την πρωτεϊνοσύνθεση. Ο AR εκφράζεται στα κύτταρα Sertoli και Leydig και στα περιωληναριακά κύτταρα. Τα γεννητικά κύτταρα δεν εκφράζουν AR (178).

Τόσο η τεστοστερόνη όσο και η FSH είναι απαραίτητες για την έναρξη της σπερματογένεσης στην εφηβεία και μέσω κοινών και ανεξάρτητων δράσεων διατηρούν σε ποσοτικά φυσιολογικά επίπεδα τη σπερματογένεση στον ενήλικα (179, 180). Μέσω της δράσης της τεστοστερόνης επάγεται η έκκριση πρωτεϊνών όπως ABP, τρανσφερρίνη, πρωτεΐνες στερρεών συνδέσεων). Η τεστοστερόνη συμβάλλει στη διαμορφωση του αιματοορχικού φραγμού και στο σχηματισμό στερρεών συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων Sertoli μέσω της αυξημένης σύνθεσης οκλουδίνης, κλαουδίνης 11, κλαουδίνης 3. Επίσης ρυθμίζει την έκφραση μορίων προσκόλλησης μεταξύ των κυττάρων Sertoli και των γεννητικών κυττάρων (επίμυες).

Η σπερματογένεση απαιτεί μεγάλη συγκέντρωση της ενδο-ορχικής τεστοστερόνης περίπου 100 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την αντίστοιχη του πλάσματος. Η πολλαπλασιαστική φάση της σπερματογένεσης φαίνεται να είναι ανδρογονο-ανεξάρτητη, κάτι τέτοιο όμως δεν φαίνεται να ισχύει για την μειωτική φάση.

Η FSH και η τεστοστερόνη είναι απαραίτητες για την έναρξη της μείωσης και την ολοκλήρωση της. Σε μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι η μεμονωμένη καταστολή της FSH και LH/T οδηγεί σε μερική διατήρηση της μείωσης συγκριτικά με τη συνδυασμένη καταστολή. Οι ορμόνες αυτές μέσω δράσης αντιαποπτωτικού παράγοντα αναστέλλουν τον κυτταρικό θάνατο των σπερματοκυττάρων και των στρογγυλών σπερματιδίων (181-183). Επίσης η συνεργική δράση τους επιτυγχάνει την ωρίμανση των σπερματιδίων και συμβάλλουν στην απελευθέρωση των σπερματοζωαρίων στον αυλό του σπερματικού σωληναρίου (177). Σε μελέτες παρατηρήθηκε ότι η μεμονωμένη καταστολή της FSH ή της LH/T οδήγησε σε πτώση 15% των απελευθερωμένων σπερματοζωαρίων ενώ η συνδυασμένη καταστολή οδήγησε σε 90% (184).

#### *Τοπικοί ρυθμιστικοί παράγοντες*

Στη σπερματογένεση εμπλέκονται και τοπικοί ρυθμιστικοί παράγοντες στους οποίους περιλαμβάνονται στεροειδή (T, E2), INSL-3/LGR8, ποικίλοι αυξητικοί παράγοντες, TGF- $\alpha$ , - $\beta$ , ινχιπίνη, ακτιβίνη, NGF, EGF, IGF-1, FGF, ανοσολογικοί παράγοντες, οπιοειδή, οξυτοκίνη, ADH, GHRH, CRH, ACTH, GnRH, ρενίνη, αγγειοτενσίνη (185, 186).

### *Θερμορύθμιση οσχέου*

Η φυσιολογική εξέλιξη της σπερματογένεσης προϋποθέτει την διατήρηση χαμηλότερης κατά 2-4 °C της θερμοκρασίας στο όσχεο από την αντίστοιχη του υπόλοιπου σώματος. Αναστρέψιμη διαταραχή της σπερματογένεσης μπορεί να προκληθεί από σημαντική αύξηση της θερμοκρασίας. Στους θερμορυθμιστικούς μηχανισμούς του οσχέου περιλαμβάνεται η αποβολή της θερμότητας μέσω του δέρματος του οσχέου, το οποίο είναι λεπτό, χωρίς παρουσία λίπους, έντονα ρυτιδωμένο και έχει μεγάλη επιφάνεια. Στην αποβολή θερμότητας συμβάλλει και το σπερματικό φλεβικό δίκτυο μέσω της δημιουργίας αντιρρεύματος με την ορχική αρτηρία στον σπερματικό τόνο. Επίσης συμβάλλει και η σύσπαση του κρεμαστήρα μυ στην έκθεση στο κρύο (187).

### *Κύκλος και κύμα της σπερματογένεσης*

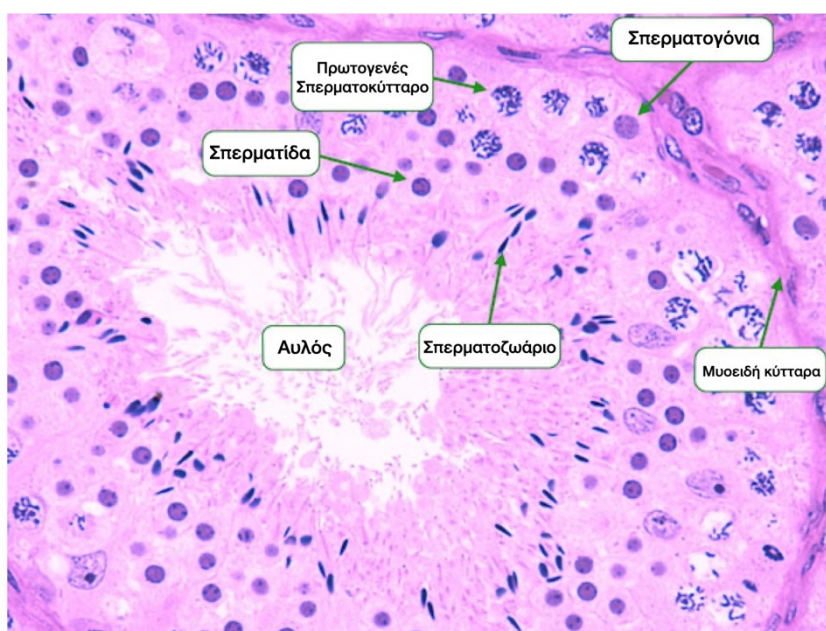
Η σπερματογένεση είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη και περίπλοκη διαδικασία που καθοδηγείται επακριβώς από την εκκρίση της GnRH, της LH και της FSH του άξονα HPG. Οι διαταραχές σε αυτό το ορμονικό περιβάλλον αποτελούν κοινά αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας. Η σπερματογένεση είναι μια διαδικασία που εξαρτάται από τα ανδρογόνα και λαμβάνει χώρα με πολύ υψηλά επίπεδα ενδο-ορχικής τεστοστερόνης (118).

Στον άνθρωπο, η διάρκεια ζωής των σπερματογόνιων είναι περίπου 16 ημέρες, για τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα 24 ημέρες, για τα δευτερογενή σπερματοκύτταρα λίγες ώρες και για τις σπερματίδες 24 ημέρες. Συνολικά η διάρκεια της σπερματογένεσης είναι περίπου 64 ημέρες (188).

Από κάθε σπερματογόνο που διαφοροποιείται δημιουργούνται 16 πρωτογενή σπερματοκύτταρα, τα οποία μέσω της μείωσης δημιουργούν τέσσερις σπερματίδες και τελικά τέσσερα σπερματοζώαρια. Συνολικά από κάθε σπερματογόνο δημιουργούνται 64 σπερματοζώαρια. Καθημερινά περίπου τρία εκατομμύρια σπερματογόνια ξεκινούν τη διαδικασία της σπερματογένεσης και υπολογίζεται ότι δίνουν γένεση σε περίπου 200 εκατομμύρια σπερματοζώαρια. Λόγω της απώλειας και της απόπτωσης περίπου των 50% αυτών, θεωρείται ότι από τους όρχεις ενός ενήλικα άνδρα παράγονται ημερησίως περίπου 100 εκατομμύρια σπερματοζώαρια (189).

Στη συνέχεια μεταφέρονται από τον αυλό των σπερματικών σωληναρίων μέσω των απαγωγών αγγείων στην κεφαλή της επιδιδυμίδας. Εκεί παραμένουν περίπου έως 12 ημέρες και υπόκεινται σε περαιτέρω ωρίμανση και αποκτούν την προς τα πίσω κίνηση.

Κατά τη διάρκεια της εκσπερμάτισης, τα σπερματοζωάρια μεταφέρονται γρήγορα μέσω των εκφορητικών σπερματικών αγωγών στην ουρήθρα από την περιφερική επιδιδυμίδα. Το σπερματικό υγρό υποστηρίζει το μεταβολισμό και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, χρησιμεύει ως αντιοξειδωτικός παράγοντας και προστατεύει τα σπερματοζωάρια στο γεννητικό σύστημα του θήλεος. Η τελική φάση ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων πραγματοποιείται στο γεννητικό σύστημα του θήλεος (190).



**Εικόνα 12.** Οι διεργασίες της σπερματογένεσης και της σπερμιογένεσης είναι συγχρονισμένες και γίνονται διαδοχικά κατά μήκος κάθε σπερματικού σωληναρίου. Συνεπώς σε κάθε δεδομένη ιστολογική τομή δεν περιλαμβάνονται όλες οι φάσεις ανάπτυξης των γαμετών.

### Διαταραχές σπερματογένεσης

#### Γενετική

Ως γενετικά αίτια της μη φυσιολογικής σπερματογένεσης έχουν αναγνωριστεί σημειακές μεταλλάξεις σε μεμονωμένα γονίδια που κληρονομούνται με Μενδελικό τρόπο (π.χ. κυστική ίνωση) και χρωμοσωμικές διαταραχές στις οποίες τμήματα χρωμοσωμάτων έχουν δομικές ή αριθμητικές ανωμαλίες (191). Η διατύπωση ότι γενετικές βλάβες στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος Y προκαλούν αζωοσπερμία έγινε πριν από τέσσερις δεκαετίες (192). Έχουν ονομαστεί μικροελλείψεις Yq και είναι ελλείψεις μικρών τμημάτων του χρωμοσώματος οι οποίες δεν είναι ορατές με το οπτικό μικροσκόπιο. Με βάση την

κυτταρογενετική ανάλυση, οι μικροελλείψεις αυτές εντοπίζονται κυρίως στον γενετικό τόπο Yq11 που ονομάστηκε περιοχή του παράγοντα αζωοσπερμίας (AZF) και περιλαμβάνει τρεις υποπεριοχές: AZFa, AZFb και AZFc (193). Οι μικροελλείψεις Yq, εμφανίζονται στο 6% έως 8% των ανδρών με σοβαρή олиγοσπερμία και στο 15% των αζωοσπερμικών ανδρών (194). Συνολικά, αυτές οι μικροελλείψεις είναι η πιο συχνή μοριακή αιτία της ανδρικής υπογονιμότητας (195).

Σε αντίθεση με τους ασθενείς μερικής και πλήρους απαλοιφής της υποπεριοχής AZFc, στους οποίους συχνά εντοπίζονται σπερματοζωάρια στην ανάλυση σπέρματος ή στη βιοψία όρχεων, η πιθανότητα ανεύρεσης σπέρματος στην εκσπερμάτιση ή στους όρχεις σε άνδρες με πλήρη απαλοιφή AZFa ή AZFb είναι απίθανη (196). Όλοι οι ασθενείς με πλήρη απαλοιφή της υποπεριοχής AZFa σχετίζονται με απλασία του σπερματικού επιθηλίου ή ιστολογική εικόνα από κύτταρα Sertoli μόνο (SCOS) (197, 198). Γενικά, η πλήρης απαλοιφή της υποπεριοχής AZFb σχετίζεται με σπερματογενετική στάση στο στάδιο του πρωτογενούς σπερματοκυττάρου ή της σπερματίδας (198, 199). Η απαλοιφή της υποπεριοχής AZFc σχετίζεται με υποσπερματογένεση ή ένα μοτίβο κυττάρων Sertoli μόνο με εστίες σπερματογένεσης (200).

Σπερματοζωάρια έχουν ανιχνευθεί στο σπερματικό υγρό ανδρών με επιβεβαιωμένη μερική απαλοιφή των υποπεριοχών AZFa και AZFb (201). Παρομοίως, σπερματοζωάρια έχουν ανιχνευθεί και στο εκσπερμάτισμα ανδρών με AZFa + b και AZFb + c (μερική απαλοιφή). Αντίθετα η απαλοιφή των AZFa - c έχει συσχετιστεί με αζωοσπερμία και απουσία ανεύρεσης σπερματοζωαρίων στη βιοψία όρχεων (201).

Τα τελευταία χρόνια, έχει καταστεί σαφές ότι και το χρωμόσωμα X είναι σημαντικό για τη σπερματογένεση και διατυπώθηκε για πρώτη φορά σε μελέτες τρωκτικών. Το 2001, ο Wang και οι συνεργάτες του αναζήτησαν γονίδια που εκφράστηκαν αποκλειστικά σε σπερματογόνια ποντικού (202). Είκοσι πέντε γονίδια ταυτοποιήθηκαν μέσω ανασυνδασμένου DNA (cDNA). Από αυτά τα 10 εντοπίστηκαν στο χρωμόσωμα X, υποδηλώνοντας ότι το χρωμόσωμα X μπορεί να έχει καθοριστικό ρόλο στα προμειωτικά στάδια της σπερματογένεσης (202).

Σε μία πρόσφατη μελέτη έγινε σύγκριση των χρωμοσωμάτων X του ποντικού και του ανθρώπου υποδηλώνοντας ότι αυτό το χρωμόσωμα μπορεί να έχει σημαντικό ρόλο στη γονιμότητα τόσο των ανδρών όσο και των γυναικών (203). Μελέτες με μεταλλάξεις γονιδίων του χρωμοσώματος X σε υπογόνιμους άνδρες αναφέρουν το γονίδιο SOX3 (sex determining region Y box 3) και το γονίδιο FATE ως δύο πιθανά γονίδια που σχετίζονται



με την γονιμότητα (204, 205). Στο μέλλον, οι μεταλλάξεις σε αυτά και σε άλλα γονίδια του χρωμοσώματος X μπορεί να δώσουν απαντήσεις για τις πολλές επί του παρόντος ιδιοπαθής περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας.

### *Γενετική και Πατρική Ηλικία*

Χρωμοσωμικές ανωμαλίες σπερματοζωαρίων που σχετίζονται με την ηλικία.

Οι περιπτώσεις ανευπλοειδίας ή πολυπλοειδίας των σπερματοζωαρίων για πρώτη φορά διερευνήθηκαν λόγω ανησυχίας ότι η προχωρημένη πατρική ηλικία συσχετίστηκε με αυξημένα περιστατικά τρισωμίας, ιδιαίτερα της τρισωμίας 21 (συνδρόμου Down) σε απογόνους. Με την τεχνολογία του φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (FISH), οι επιδράσεις της πατρικής ηλικίας στην ανευπλοειδία του σπέρματος είναι πλέον εμφανείς. Η επίδραση της πατρικής ηλικίας φαίνεται να αυξάνει το ποσοστό του σπέρματος με χρωμοσωμικές φυλετικές ανευπλοειδίες (206).

Ωστόσο, υπάρχουν λίγες ενδείξεις που να υποστηρίζουν ότι η αύξηση των γεννήσεων με ανευπλοειδία σχετίζονται με την πατρική ηλικία, εκτός από πιθανώς τη τρισωμία 21 και δυσομία 1 (πολύ σπάνια). Εξετάζοντας τις δομικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων των σπερματοζωαρίων, οι Martin και Rademaker (1987) διαπίστωσαν ότι υπάρχει σημαντική γραμμική σχέση μεταξύ της πατρικής ηλικίας και της συχνότητας των δομικών ανωμαλιών στα σπερματοζωάρια ( $r = 0,63$ ). Μία εξήγηση για αυτή την συσχέτιση μπορεί να είναι ότι η συνεχιζόμενη κυτταρική διαίρεση κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης θέτει τα γεννητικά κύτταρα σε κίνδυνο για χρωμοσωμικές βλάβες, ειδικά σε άνδρες με προχωρημένη ηλικία. Εκτός από τις αμοιβαίες μετατοπίσεις, υπάρχουν λίγα στοιχεία που δείχνουν ότι αυτή η συσχέτιση οδηγεί σε αυξημένη συχνότητα απογόνων με *de novo* δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες (207).

### *Γενετικές μεταλλάξεις σπερματοζωαρίων που σχετίζονται με την ηλικία.*

Ελλείψεις ενός γονιδίου στα σπερματοζωάρια οφείλονται σε σφάλματα κατά τη διάρκεια της ανασύνθεσης του DNA. Μέχρι σήμερα, ήταν δύσκολο να εκτιμηθεί η παρουσία ή η απουσία τέτοιων ελλείψεων στα σπερματοζωάρια. Ωστόσο, η επίδραση της προχωρημένης πατρικής ηλικίας στις καταστάσεις απογόνων που σχετίζονται με απαλοιφή ενός γονιδίου είναι σαφής (208).

*Επιγενετικές αλλαγές σπέρματος που σχετίζονται με την ηλικία.*

Υπάρχουν ενδείξεις ότι επιγενετικοί τροποποιητές της γονιδιακής έκφρασης όπως η μεθυλίωση του DNA των σπερματοζωαρίων μεταβάλλονται με την πάροδο της ηλικίας του άνδρα (209). Τα σπερματοζωάρια φαίνεται να συσσωρεύουν εκατοντάδες βλάβες μεθυλίωσης του DNA με την πάροδο της ηλικίας που εντοπίζονται σε συγκεκριμένες γονιδιωματικές θέσεις, πολλά από τα οποία ελέγχουν γονίδια που σχετίζονται με νευροαναπτυξιακή ανάπτυξη (π.χ. σχιζοφρένεια, διπολική διαταραχή, αυτισμός, διαταραχές της διάθεσης). Σε μια μελέτη εξετάστηκαν δείγματα σπέρματος δύο φορές, μία φορά όταν οι άνδρες ήταν νέοι και ξανά όταν ήταν μεγαλύτεροι, ο ρυθμός της επιγενετικής μεταβολής στο σπέρμα διπλασιάστηκε σε σχέση με τους άλλους ιστούς του σώματος (209). Επίσης οι επιγενετικές μεταβολές που σημειώθηκαν στο σπέρμα καθώς οι άνδρες γερνούσαν τείνουν να συσσωρεύονται σε γονίδια που σχετίζονται με σχιζοφρένεια και διπολική διαταραχή. Έτσι, τουλάχιστον ένα υποσύνολο διαταραχών που σχετίζονται με την πατρική ηλικία στους απογόνους μπορεί να είναι συνέπεια επιγενετικών μεταβολών που μεταδίδονται στα σπερματοζωάρια (210).

## **Ανδρική υπογονιμότητα**

### Ορισμός και ταξινόμηση

Με τον όρο υπογονιμότητα ορίζεται η αδυναμία ενός σεξουαλικά ενεργού ζευγαριού χωρίς να λαμβάνει μέτρα αντισύλληψης, να επιτύχει αυθόρμητη εγκυμοσύνη μέσα σε ένα έτος (211). Η πρωτοπαθής υπογονιμότητα αναφέρεται σε ζευγάρια που δεν είχαν ποτέ παιδιά και δεν μπορούν να επιτύχουν εγκυμοσύνη μετά από τουλάχιστον δώδεκα συνεχόμενους μήνες σεξουαλικής επαφής χωρίς να χρησιμοποιούν μεθόδους αντισύλληψης. Η δευτεροπαθής υπογονιμότητα αναφέρεται σε υπογόνιμα ζευγάρια που κατάφεραν να επιτύχουν εγκυμοσύνη τουλάχιστον μία φορά στο παρελθόν (212).

### Επιδημιολογία

Περίπου το 15% των ζευγαριών δεν θα επιτύχουν εγκυμοσύνη εντός του έτους και αναζητούν ιατρική βοήθεια για υπογονιμότητα. Ένα στα οκτώ ζευγάρια αντιμετωπίζει προβλήματα όταν επιχειρεί να αποκτήσει το πρώτο παιδί και ένα στα έξι όταν προσπαθεί να αποκτήσει το επόμενο παιδί. Παραμένουν χωρίς τη θέληση τους χωρίς παιδιά περίπου το 3% των γυναικών που προσπαθούν να αποκτήσουν, ενώ το 6% των γυναικών που έχουν αποκτήσει παιδί, δεν είναι σε θέση να έχουν όσα παιδιά επιθυμούν (213). Στο 50% των ζευγαριών που παραμένουν χωρίς παιδιά παρά τη θέληση τους, ανευρίσκεται ένας παράγοντας που σχετίζεται με την ανδρική υπογονιμότητα συνήθως μαζί με μη φυσιολογικές παραμέτρους σπέρματος (211). Για το λόγο αυτό, όλοι οι άνδρες ασθενείς που ανήκουν σε υπογόνιμα ζευγάρια θα πρέπει να υποβληθούν σε ιατρική εκτίμηση από ουρολόγο εκπαιδευμένο στην ανδρική αναπαραγωγή.

### Αιτιολογία

Τα αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας μπορεί να διακριθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: 1) Τα προ-ορχικά που οφείλονται σε διαταραχές της λειτουργίας του υποθάλαμου και της υπόφυσης. 2) Τα ορχικά που οφείλονται σε διαταραχές της λειτουργίας των όρχεων. 3) Τα μετα-ορχικά που οφείλονται σε ανωμαλίες της αποχετευτικής οδού του σπέρματος (211).

*Πίνακας 1: Αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας (214).*

ΠΡΟ-ΟΡΧΙΚΑ ΑΙΤΙΑ	
Παθήσεις του υποθαλάμου	-Σύνδρομο Kallmann -Σύνδρομο γόνιμου ευνούχου -Μεμονωμένη ανεπάρκεια της FSH -Συγγενή υπογοναδοτροπικά σύνδρομα (σύνδρομα Prader-Willi, Bardet-Biedl)
Παθήσεις της υπόφυσης	-Υποφυσιακή ανεπάρκεια (ανεπάρκεια FSH και LH) -Υπερπρολακτιναιμία
Λοιπές ορμονικές διαταραχές	-Υπεροιστρογοναιμία -Υπερανδρογοναιμία -Αύξηση των γλυκοκορτικοειδών -Υπερ- και υποθυρεοειδισμός
Συστηματικές παθήσεις	-Χρόνια νεφρική νόσος -Κίρρωση ήπατος -Δρεπανοκυτταρική αναιμία -Λοιμώξεις ουροποιογεννητικού
ΟΡΧΙΚΑ ΑΙΤΙΑ	
Συχνά γενετικά αίτια	-Σύνδρομο Klinefelter (47,XXY) -Μικροελλείψεις του χρωμοσώματος Y
Άλλα γενετικά αίτια και σύνδρομα	-Σύνδρομο υπεράρρενος (47,XY <sup>Y</sup> ) -Σύνδρομο αναστροφής του φύλου (46,XX) -Σύνδρομο Noonan -Μυοτονική δυστροφία -Απλασία του σπερματικού επιθηλίου -Αναστολή ωρίμανσης σπερματοζωαρίων -Αμφοτερόπλευρη ανορχία
Γοναδοτοξικοί παράγοντες	-Ακτινοβολία -Χημειοθεραπευτικά φάρμακα -Αλκοόλ -Μαριχουάνα, Ηρωίνη -Διάφορα φάρμακα -Υψηλές Θερμοκρασίες

Διάφορες παθήσεις των όρχεων	-Κιρσοκήλη -Κρυψορχία -Όρχιτιδα -Συστροφή -Τραύμα
Συστηματικές παθήσεις	-Χρόνια νεφρική νόσος -Κίρρωση του ήπατος -Δρεπανοκυτταρική αναιμία -Σακχαρώδης διαβήτης
<b>META-ΟΡΧΙΚΑ ΑΙΤΙΑ</b>	
Συγγενής απόφραξη της αποχετευτικής οδού του σπέρματος	-Κυστική ίνωση -Σύνδρομο Young -Νόσος πολυκυστικών νεφρών των ενηλίκων -Ιδιοπαθής απόφραξη της επιδιδυμίδας -Ατρησία των εκσπερματιστικών πόρων -Απόφραξη των εκσπερματιστικών πόρων
Επίκτητη απόφραξη της αποχετευτικής οδού του σπέρματος	-Απολίνωση των σπερματικών πόρων -Επεμβάσεις βουβωνοκήλης -Επιδιδυμίτιδα
Διαταραχές εκσπερμάτισης	-Σκλήρυνση κατά πλάκας -Σακχαρώδης διαβήτης -Οπισθοπεριτοναϊκός λεμφαδενικός καθαρισμός -Κακώσεις του νωτιαίου μυελού -Πρόσληψη φαρμάκων
Διαταραχές της κινητικότητας και της λειτουργικότητας των σπερματοζωαρίων	-Σύνδρομο Kartagener -Διαταραχές ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων -Αντισπερμικά αντισώματα -Λοιμώξεις του ουροποιογεννητικού συστήματος
Σεξουαλική δυσλειτουργία	-Στυτική δυσλειτουργία, -Ελαττωμένη λίμπιντο -Διαταραχές εκσπερμάτισης

Στο 30-40% των περιπτώσεων, κανένας γνωστός παράγοντας που να σχετίζεται με την ανδρική υπογονιμότητα δεν ανευρίσκεται και σε αυτές τις περιπτώσεις αναφέρεται ως ιδιοπαθής ανδρική υπογονιμότητα. Οι άνδρες αυτοί δεν έχουν προηγούμενο ιστορικό ασθενειών που επηρεάζουν τη γονιμότητα και δεν ανευρίσκεται κάποια παθολογία από την φυσική εξέταση και τις ενδοκρινικές, γενετικές και βιοχημικές εργαστηριακές εξετάσεις, παρόλο που έχουν μη φυσιολογικό σπερμοδιάγραμμα. Από την άλλη πλευρά, η ανεξήγητη ανδρική υπογονιμότητα ορίζεται ως υπογονιμότητα αγνώστου αιτιολογίας με φυσιολογικές παραμέτρους σπέρματος. Πιστεύεται τώρα ότι η ιδιοπαθής ανδρική υπογονιμότητα μπορεί να σχετίζεται με αρκετούς παθολογικούς παράγοντες που δεν είχαν αναγνωριστεί προηγουμένως, οι οποίοι περιλαμβάνουν αλλά δεν περιορίζονται σε ενδοκρινικές διαταραχές ως αποτέλεσμα της περιβαλλοντικής ρύπανσης, της δημιουργίας οξειδωτικού στρες/κατακερματισμό στο DNA του σπέρματος ή γενετικών και επιγενετικών ανωμαλιών (215). Η προχωρημένη ηλικία του πατέρα έχει αναδειχθεί ως ένας από τους κύριους παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την προοδευτική αύξηση του επιπολασμού της υπογονιμότητας που οφείλεται στον ανδρικό παράγοντα (216-219).

#### Διαγνωστική προσέγγιση

Η ενδεδειγμένη διαγνωστική προσέγγιση του υπογόνιμου άνδρα θα πρέπει πάντα να περιλαμβάνει: το ιατρικό και σεξουαλικό ιστορικό, την φυσική εξέταση, το σπερμοδιάγραμμα - με αυστηρή τήρηση των τιμών αναφοράς του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) για τα χαρακτηριστικά του ανθρώπινου σπέρματος (220) και τον ορμονικό έλεγχο. Άλλες εξετάσεις (π.χ. γενετική ανάλυση και απεικόνιση) μπορεί να απαιτούνται ανάλογα με τα κλινικά χαρακτηριστικά και τις παραμέτρους του σπέρματος.

#### Βασικός έλεγχος της ανδρικής υπογονιμότητας

##### Ιατρικό και σεξουαλικό ιστορικό

Το ιατρικό ιστορικό αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο της διάγνωσης της ανδρικής υπογονιμότητας. Από το ιστορικό θα πρέπει να αξιολογηθούν τυχόν παράγοντες κινδύνου που είχαν επίπτωση στη γονιμότητα του άνδρα, όπως ο τρόπος ζωής, το οικογενειακό ιστορικό (συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου των όρχεων), οι συνοδές παθήσεις (συστηματικές παθήσεις όπως υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, παχυσαρκία, καρκίνος

των όρχεων, κ.λπ.), το ιστορικό λοιμώξεων του ουρογεννητικού συστήματος (συμπεριλαμβανομένων, σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων), ιστορικό χειρουργικής επέμβασης στους όρχεις και η έκθεση σε πιθανές γοναδοτοξίνες.

### Φυσική εξέταση

Η κλινική εξέταση του ασθενούς θα πρέπει να περιλαμβάνει όλα τα συστήματα, παρέχοντας πληροφορίες για την γενική του κατάσταση και για την παρουσία των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου. Η πτωχή ανάπτυξη δευτερευόντων χαρακτηριστικών του φύλου, η απουσία τριχοφυΐας και γενιού, η λεπτή φωνή, η μειωμένη σεξουαλική ορμή, η μη φυσιολογική μυϊκή διάπλαση, η ευνουχοειδής ανάπτυξη των έξω γεννητικών οργάνων και η γυναικομαστία είναι χαρακτηριστικά σημεία υπογοναδισμού.

Πρέπει να αξιολογηθεί το μέγεθος, η θέση και η σύσταση των όρχεων. Στην κλινική πράξη, το μέγεθος και συγκεκριμένα ο όγκος των όρχεων εκτιμάται με το ορχιδόμετρο του Prader (221). Η ύπαρξη του σπερματικού πόρου, η διογκωμένη επιδιδυμίδα και η παρουσία κισσοκήλης θα πρέπει πάντα να ελέγχονται. Επίσης πρέπει να γίνεται δακτυλική εξέταση του προστάτη. Οι μικροί όρχεις είναι σημεία υπογοναδισμού και συνοδεύονται από βλάβες του σπερματικού επιθηλίου, ενώ οι πολύ μικροί όρχεις παρατηρούνται σε άτομα με σύνδρομο Klinefelter. Μαλθακή σύσταση παρατηρείται σε άτομα με διαταραχές της σπερματογένεσης, ενώ η ψηλαφητή σκληρία θέτει την υπόνοια κακοήθειας. Θα πρέπει επίσης να αξιολογηθούν διαταραχές του πέους όπως φίμωση, βραχύς χαλινός, επισπαδίας, υποσπαδίας.

### Σπερμοδιάγραμμα

Το σπερμοδιάγραμμα θεωρείται η «ταυτότητα» της γονιμότητας του άνδρα.

Πλήρης ανδρολογική εξέταση ενδείκνυται πάντα εάν η ανάλυση σπέρματος εμφανίζει διαταραχές σε σύγκριση με τις τιμές αναφοράς (Πίνακας 2). Σημαντικές αποφάσεις θεραπείας βασίζονται στα αποτελέσματα του σπερμοδιαγράμματος.

Η εκτέλεση και αξιολόγηση της ανάλυσης σπέρματος θα πρέπει να ακολουθεί τις οδηγίες του εγχειριδίου του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας «Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen» (5<sup>η</sup> έκδοση) (222).

**Πίνακας 2:** Κατώτερες τιμές αναφοράς (5<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση και 95<sup>η</sup> διάστημα εμπιστοσύνης) για τα χαρακτηριστικά του σπέρματος (222).

<b>Παράμετρος</b>	<b>Κατώτερες τιμές αναφοράς (διακύμανση)</b>
Όγκος σπέρματος (ml)	1,5 (1,4-1,7)
Συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων (10 <sup>6</sup> /εκσπερμάτιση)	39 (33-46)
Συγκέντρωση σπερματοζωαρίων (10 <sup>6</sup> /ml)	15 (12-16)
Συνολική κινητικότητα (προοδευτική + μη-προοδευτική,%)	40 (38-42)
Προοδευτική κινητικότητα (%)	32 (31-34)
Ζωτικότητα (ζωντανά σπερματοζώαρια,%)	58 (55-63)
Μορφολογία σπερματοζωαρίων (φυσιολογικές μορφές, %)	4 (3,0-4,0)
Άλλες τιμές	
pH	> 7,2
Υπεροξειδάση-θετικά λευκύτταρα (10 <sup>6</sup> /ml)	< 1,0
Προαιρετικές εξετάσεις	
Δοκιμασία MAR (Mixed Agglutination Reaction) (κινητά σπερματοζώαρια με δεσμευμένα σωματίδια, %)	< 50
Δοκιμασία IBT (Immunobead Test) (κινητά σπερματοζώαρια με δεσμευμένα σφαιρίδια, %)	< 50
Ψευδάργυρος σπέρματος (μmol/εκσπερμάτιση)	, 2,4
Φρουκτόζη σπέρματος (μmol/εκσπερμάτιση)	, 13
Ουδέτερη γλυκοσιδάση σπέρματος (mU/εκσπερμάτιση)	f 20



Εάν τα αποτελέσματα της ανάλυσης σπέρματος είναι εντός των ορίων της WHO, αρκεί μόνο ένα σπερμοδιάγραμμα. Εάν τα αποτελέσματα δεν είναι φυσιολογικά σε τουλάχιστον δύο σπερμοδιαγράμματα, ενδείκνυται περαιτέρω ανδρολογική διερεύνηση.

Είναι σημαντικό να γίνει διάκριση μεταξύ των παρακάτω:

- ολιγοσπερμία: <15 εκατομμύρια σπερματοζωάρια/mL
- ασθενοσπερμία: <32% των σπερματοζωαρίων με προοδευτική κινητικότητα
- τερατοσπερμία: <4% των σπερματοζωαρίων με φυσιολογικές μορφές

Συχνά, και οι τρεις ανωμαλίες συμβαίνουν ταυτόχρονα, η οποία ορίζεται ως σύνδρομο ολιγο-ασθενο-τερατοσπερμίας (OAT). Αζωοσπερμία είναι η πλήρης απουσία σπερματοζωαρίων στο εκσπερμάτισμα (223).

Ωστόσο, κατέστη επίσης σαφές από μελέτες ότι μπορεί να απαιτούνται εξειδικευμένες εξετάσεις από την ανάλυση σπέρματος, ιδίως σε άνδρες που ανήκουν σε ζευγάρια με επαναλαμβανόμενη απώλεια κύησης από φυσική σύλληψη ή μέσω τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART) και σε άνδρες με ανεξήγητη ανδρική υπογονιμότητα. Σε αυτούς τους ασθενείς υπάρχουν ενδείξεις ότι το DNA του σπέρματος μπορεί να υποστεί κατακερματισμό με αποτέλεσμα την αποτυχία της εγκυμοσύνης (215).

#### Διαχείριση παθολογικού σπερμοδιαγράμματος

##### *Ορμονικός έλεγχος*

Σε περιπτώσεις ολιγοσπερμίας και αζωοσπερμίας, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί ορμονικός έλεγχος. Σημαντικές πληροφορίες για τη σπερματογένεση μας παρέχει η αξιολόγηση της λειτουργίας του άξονα HPG που επιτυγχάνεται σε μεγάλο βαθμό με τον προσδιορισμό των επιπέδων πλάσματος της FSH, LH και τεστοστερόνης. Επίσης συμπληρωματικά στον ορμονικό έλεγχο μπορεί να προστεθεί και ο έλεγχος της προλακτίνης, της TSH, FT3, FT4, E2 (224).

Σε άνδρες με ορχική ανεπάρκεια, ο υπεργοναδοτροπικός υπογοναδισμός (που ονομάζεται επίσης πρωτοπαθής υπογοναδισμός) είναι συνήθως παρών, με υψηλά επίπεδα FSH και LH, με ή χωρίς χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης. Γενικά, τα επίπεδα της FSH συσχετίζονται αρνητικά με τον αριθμό των σπερματογόνιων (225). Όταν τα σπερματογόνια απουσιάζουν ή μειώνονται σημαντικά, οι τιμές της FSH συνήθως

αυξάνονται. Όταν ο αριθμός των σπερματογόνιων είναι φυσιολογικός, αλλά υπάρχει διακοπή της ωρίμανσης στο επίπεδο των σπερματοκυττάρων ή των σπερματοειδών, οι τιμές της FSH είναι συνήθως εντός των φυσιολογικών ορίων (225).

#### *Καλλιέργεια σπέρματος*

Η καλλιέργεια σπέρματος ελέγχει την παρουσία και τον τύπο των παθογόνων μικροοργανισμών όταν υπάρχουν ευρήματα φλεγμονής από την κλινική εξέταση ή όταν υπάρχει αυξημένη παρουσία πυοσφαιρίων ( $> 10^6/\text{ml}$ ) στην ανάλυση σπέρματος που συνήθως υποδηλώνουν φλεγμονή των επικουρικών γεννητικών αδένων. Η φλεγμονή του γεννητικού συστήματος επηρεάζει αρνητικά τη γονιμότητα λόγω πρόκλησης ασθenoσπερμίας ή αύξησης των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (224).

#### *Βιοχημικός έλεγχος της εκκριτικής λειτουργίας των επικουρικών αδένων*

Το σπέρμα είναι εναιώρημα σπερματοζωαρίων μέσα στο σπερματικό υγρό το οποίο είναι μείγμα εκκρίσεων του όρχεως και της επιδιδυμίδας καθώς και του προστάτη και των σπερματοδόχων κύστεων. Για την εκτίμηση της λειτουργίας του προστάτη μετρούνται τα επίπεδα του ψευδάργυρου σπέρματος ( $\mu\text{mol}/\text{εκσπερμάτιση}$ ), για την εκτίμηση της λειτουργίας των σπερματοδόχων κύστεων η φρουκτόζη σπέρματος ( $\mu\text{mol}/\text{εκσπερμάτιση}$ ) και για την εκτίμηση της εκκριτικής λειτουργίας της επιδιδυμίδας, η ουδέτερη γλυκοσιδάση σπέρματος ( $\text{mU}/\text{εκσπερμάτιση}$ ). Βιοχημικός έλεγχος του σπέρματος ενδείκνυται όταν ο όγκος σπέρματος είναι χαμηλός, όταν παρατηρείται ταχεία μείωση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων, στην αζωοσπερμία χωρίς υψηλή τιμή FSH και στην ανεξήγητη υπογονιμότητα (224).

#### *Αντισπερμικά αντισώματα*

Τα αντισπερμικά αντισώματα παράγονται σε περίπτωση διαταραχής του αιματο-ορχικού φραγμού. Παρατηρούνται σε καταστάσεις απόφραξης της αποχετευτικής οδού, φλεγμονής των επικουρικών γεννητικών αδένων, συστροφής, τραύματος και κρυοσπορχίας. Ο έλεγχος των αντισπερματικών αντισωμάτων ενδείκνυται όταν εμφανίζεται σοβαρά μειωμένη κινητικότητα λόγω μεγάλης συγκολλητικότητας των σπερματοζωαρίων, αυξημένη πυοσπερμία και ιδιοπαθή υπογονιμότητα. Οι τρόποι για τη μέτρηση των αντισπερμικών αντισωμάτων που προτείνονται από τη WHO είναι η δοκιμασία IBT και η δοκιμασία MAR.

*Λειτουργικές δοκιμασίες της γονιμοποιητικής ικανότητας των σπερματοζωαρίων*

Στην ανεξήγητη υπογονιμότητα σε ένα σημαντικό ποσοστό δεν ανευρίσκεται κάποιο αίτιο. Σε αυτές τις περιπτώσεις γίνεται έλεγχος των μηχανισμών του σπερματοζωαρίου που ευθύνονται για τη γονιμοποίηση του ωαρίου. Αυτές οι λειτουργικές δοκιμασίες είναι:

- Δοκιμασία σχέσης σπερματοζωαρίων-τραχηλικής βλέννης
- Δοκιμασία υποοσμωτικής διόγκωσης των σπερματοζωαρίων (Hypo-Osmotic Swelling test- HOS test)
- Δοκιμασία σύνδεσης των σπερματοζωαρίων με τη διαυγή ζώνη του ωαρίου (Human zona pellucida binding test)
- Εκτίμηση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στο σπερματικό υγρό (Reactive Oxygen Species-ROS)
- Μέτρηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων με τη χρήση αυτόματου αναλυτή (Computer Assisted Sperm Analysis, GASA)
- Δοκιμασία διεισδυτικότητας του σπερματοζωαρίου σε ωάριο hamster (zona-free hamster oocuity test)
- Αντίδραση του ακροσώματος
- Μέτρηση του δείκτη κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων (DFI).

*Μέτρηση του δείκτη κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων (DFI)*

Ο κατακερματισμός του DNA των σπερματοζωαρίων είναι μια βλάβη που συμβαίνει στο γεννητικό υλικό των σπερματοζωαρίων. Η βλάβη αυτή συνήθως είναι μία μεταβολή ή μία διατομή σε ένα ή και στα δύο σκέλη της διπλής έλικας του DNA που προκαλεί δομική αστάθεια. Έχει αποδειχθεί ότι η αύξηση του δείκτη κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων μειώνει τις πιθανότητες φυσικής σύλληψης. Σε αυτό το πλαίσιο, η βλάβη στο DNA των σπερματοζωαρίων είναι πιο συχνή στους υπογόνιμους άνδρες και έχει αναγνωριστεί ως ένας σημαντικός παράγοντας για την ανδρική υπογονιμότητα, καθώς και για τα φτωχότερα αποτελέσματα μετά την ART (226, 227), συμπεριλαμβανομένης της εξασθενημένης ανάπτυξης του εμβρύου (226), αποβολής, επαναλαμβανόμενης απώλειας εγκυμοσύνης (226, 228) και γενετικές ανωμαλίες στους απογόνους (226). Ο κατακερματισμός του DNA του σπέρματος μπορεί να αυξηθεί με διάφορους παράγοντες, όπως ορμονικές διαταραχές, κίρσοκλήλη, χρόνια λοίμωξη και παράγοντες τρόπου ζωής (π.χ. κάπνισμα) (227). Έχει αναφερθεί ότι το σπέρμα των όρχεων έχει χαμηλότερα επίπεδα DFI σε σύγκριση με το σπέρμα της εκσπερμάτισης (229).

*Γενετικές δοκιμασίες*

Σε άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία ή βαριά ολιγοσπερμία ο χρωμοσωμικός έλεγχος συνίσταται στην ανάλυση του καρυότυπου και στον έλεγχο μικροελλείψεων στο χρωμόσωμα Y με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Σε άνδρες αποφρακτική αζωοσπερμία πρέπει να γίνει έλεγχος για μεταλλάξεις και πολυμορφισμό ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων.

Οι άνδρες με πολύ χαμηλό αριθμό σπερματοζωαρίων έχουν ακόμη πιθανότητα πατρότητας μέσω της εξωσωματικής γονιμοποίησης, της ICSI σε συνδυασμό με θεραπευτική βιοψία όρχεως σε περιπτώσεις αζωοσπερμίας. Ωστόσο, τα σπερματοζώαρια των υπογόνιμων ανδρών που εντοπίζονται επεμβατικά έχουν αυξημένο κίνδυνο ανευπλοειδίας, δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών και βλάβης στο DNA, αποτελώντας κίνδυνο μετάδοσης γενετικών ανωμαλιών στην επόμενη γενιά. Σε αυτές τις περιπτώσεις πραγματοποιείται χρωμοσωμική ανάλυση ή καρυότυπος, μία εξέταση που αξιολογεί τον αριθμό και την δομή των χρωμοσωμάτων του ανθρώπου προκειμένου να ανιχνεύσει ανωμαλίες σε αυτά. Πραγματοποιείται ανάλυση των χρωμοσωμάτων από λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Ωστόσο, ο έλεγχος χρωμοσωμικών ανωμαλιών στα σπερματοζώαρια (ανευπλοειδία σπέρματος) είναι επίσης εφικτός και μπορεί να πραγματοποιηθεί σε επιλεγμένες περιπτώσεις (π.χ. επαναλαμβανόμενη αποβολή) (230-232).

*Χρωμοσωμικές ανωμαλίες*

Οι ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων μπορεί να είναι αριθμητικές (π.χ. τρισωμία) ή δομικές (π.χ. αντιστροφές ή μετατοπίσεις). Γενετική συμβουλευτική και ανάλυση του καρυότυπου ενδείκνυται επί του παρόντος σε άνδρες με αζωοσπερμία ή σοβαρή ολιγοσπερμία (<10 εκατομμύρια σπερματοζώαρια/mL) (233). Εάν υπάρχει οικογενειακό ιστορικό επαναλαμβανόμενων αποβολών, δυσμορφιών ή νοητικής υστέρησης, θα πρέπει να διερευνάται με καρυότυπο, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του σπέρματος.

*Διαταραχές φυλετικών χρωμοσωμάτων*

(Σύνδρομο Klinefelter και παραλλαγές [47,XXY 46,XY/47,XXY μωσαϊκό])

Το σύνδρομο Klinefelter είναι η συχνότερη χρωμοσωμική διαταραχή του φύλου (234). Εμφανίζεται μόνο σε άνδρες και χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός επιπλέον χρωμοσώματος X. Ο φαινότυπος ποικίλει και μπορεί ένας άντρας με σύνδρομο Klinefelter μπορεί να μη γίνει εύκολα αντιληπτός. Οι άντρες αυτοί έχουν μικρούς όρχεις μαζί με

χαρακτηριστικά πρωτοπαθούς υπογοναδισμού όπως γυναικομαστία. Ο φαινότυπος είναι το τελικό αποτέλεσμα ενός συνδυασμού μεταξύ γενετικών, ορμονικών και ηλικιακών παραγόντων (235). Στη συντριπτική πλειονότητα των περιπτώσεων, η υπογονιμότητα και ο μειωμένος όγκος των όρχεων είναι τα μόνα κλινικά χαρακτηριστικά που μπορούν να ανιχνευθούν. Η λειτουργία των κυττάρων Leydig είναι επίσης συνήθως επηρεασμένη σε άνδρες με σύνδρομο Klinefelter και επομένως η ανεπάρκεια τεστοστερόνης παρατηρείται συχνότερα από αυτή του γενικού πληθυσμού, αν και σπάνια παρατηρείται κατά την περίοδο της εφηβείας, η οποία εμφανίζεται συνήθως φυσιολογικά (235, 236). Σπάνια, πιο έντονα σημεία και συμπτώματα υπογοναδισμού μπορεί να υπάρχουν, μαζί με συγγενείς ανωμαλίες, συμπεριλαμβανομένων καρδιακών και νεφρικών προβλημάτων (237).

Η παρουσία γεννητικών κυττάρων και παραγωγής σπέρματος ποικίλλει σε άνδρες με σύνδρομο Klinefelter και παρατηρείται συχνότερα στο μωσαϊκό καρυότυπο, 46, XY/ 47, XXY. Σε ασθενείς με αζωοσπερμία, στη θεραπευτική βιοψία όρχεως μπορούν να αναυρεθούν σπερματοζωάρια έως και στο 50% των περιπτώσεων (238, 239).

#### *Διαταραχές αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων*

Η γενετική συμβουλευτική πρέπει να προσφέρεται σε όλα τα ζευγάρια που αναζητούν θεραπεία γονιμότητας (συμπεριλαμβανομένης της εξωσωματικής γονιμοποίησης / ICSI) όταν ο άντρας σύντροφος έχει αυτοσωμιακή ανωμαλία. Οι πιο συχνές αυτοσωμιακές ανωμαλίες του καρυότυπου είναι οι μεταθέσεις ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων (κατά Robertson), οι αμοιβαίες μεταθέσεις, οι αναστροφές. Όπως και με το σύνδρομο Klinefelter, η ανάλυση FISH σπέρματος παρέχει μια πιο ακριβή εκτίμηση κινδύνου των προσβεβλημένων απογόνων. Όταν πραγματοποιείται IVF / ICSI για άνδρες με μετατοπίσεις, πρέπει να πραγματοποιηθεί PGD (προεμφυτευτική γενετική διάγνωση) ή αμνιοπαρακέντηση (240, 241).

#### *Μεταλλάξεις του γονιδίου της κυστικής ίνωσης*

Η κυστική ίνωση (CF) είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη νόσος (242). Είναι η πιο συχνή γενετική νόσος των Καυκάσιων. Περίπου το 4% είναι φορείς γονιδιακών μεταλλάξεων που εμπλέκουν το γονίδιο του ρυθμιστή της διαμεμβρανικής αγωγιμότητας της κυστικής ίνωσης (CFTR), το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7p. Το CFTR είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση μιας ρυθμιστικής πρωτεΐνης μεμβράνης. Η πρωτεΐνη αυτή είναι απαραίτητη για τη διέλευση του χλωρίου διαμέσου των μεμβρανών των επιθηλιακών κυττάρων και

επηρεάζει το σχηματισμό του εκσπερματιστικού πόρου, της σπερματοδόχου κύστης, του σπερματικού πόρου και των άπω 2/3 της επιδιδυμίδας. Η συγγενής αμφοτεροπλεύρη απουσία του σπερματικού πόρου (CBAVD) σχετίζεται με μεταλλάξεις του γονιδίου CFTR και βρέθηκε επίσης σε ~ 2% των ανδρών με αποφρακτική αζωοσπερμία. Η κλινική διάγνωση της απουσίας του σπερματικού πόρου είναι εύκολη και όλοι οι άνδρες με αζωοσπερμία πρέπει να εξεταστούν πολύ προσεκτικά για να αποκλειστεί η CBAVD, ιδιαίτερα εκείνοι με όγκο σπέρματος <1,0 mL, όξινο pH <7,0 και χαμηλή φρουκτόζη (57, 243, 244).

#### *Μικροελλείψεις Y - μερική και πλήρης*

Οι μικροελλείψεις του χρωμοσώματος Y είναι μια οικογένεια γενετικών διαταραχών που προκαλούνται από ελλείψεις γονιδίων στο χρωμόσωμα Y. Αφορούν τρεις περιοχές που ευρίσκονται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος Y: η AZFa, η AZFb και η AZFc (193). Λόγω του ότι πάντα διαγράφονται πολλά γονίδια μαζί δεν μπορεί να γίνει ξεκάθαρος ο ρόλος του κάθε ενός γονιδίου ξεχωριστά. Διαγραφή ενός μόνο γονιδίου έχει αναφερθεί στην περιοχή AZFa και αφορούσε το γονίδιο USP9Y. Από αυτές τις μελέτες φαίνεται ότι το USP9Y είναι πιθανότατα ένας ρυθμιστής της σπερματογένεσης (245).

Δεν απαντώνται σε άνδρες με φυσιολογικό σπερμοδιάγραμμα και είναι σπάνιες σε συγκέντρωση σπερματοζωαρίων > 5 εκατομμύρια/mL (~ 0,7%) (246). Η συχνότητα διαγραφής Y είναι υψηλότερη σε άνδρες με αζωοσπερμία (8-12%), ακολουθούμενη από ολιγοσπερμία (3-7%) (247, 248). Η πλήρης διαγραφή της περιοχής AZFa σχετίζεται με την εμφάνιση συνδρόμου από κύτταρα Sertoli μόνο (Sertoly cell only syndrome) ενώ οι πλήρεις διαγραφές της περιοχής του AZFb συνδέονται με σπερματογενετική στάση. Οι διαγραφές της περιοχής AZFc προκαλούν φαινότυπο που κυμαίνεται από αζωοσπερμία έως ολιγοσπερμία. Σε πλήρη έλλειψη AZFa και AZFb η θεραπευτική βιοψία όρχεως δεν έχει ένδειξη (196, 198). Σπερματοζωάρια μπορεί να βρεθούν στο 50% έως 75% των ανδρών με μικροελλείψεις AZFc (196, 198, 249). Άνδρες με μικροελλείψεις AZFc που είναι ολιγοσπερμικοί ή στους οποίους βρίσκονται σπερματοζωάρια κατά τη θεραπευτική βιοψία όρχεως πρέπει να γνωρίζουν ότι η διαγραφή στο Yq θα κληρονομηθεί σε κάθε άρρεν απόγονο αλλά όχι στο θήλυ. Οι πλήρεις διαγραφές AZF δεν σχετίζονται με κρυφορχία ή καρκίνο των όρχεων (250, 251). Μικροελλείψεις στο χρωμόσωμα Y θα πρέπει να ελεγχονται στην μη αποφρακτική αζωοσπερμία και στη βαριά ολιγοσπερμία (<5 εκατομμύρια/mL) (252). Δεν χρειάζεται να ελεγχθούν για μικροελλείψεις άνδρες με αποφρακτική αζωοσπερμία.

### *Απεικονιστικός έλεγχος*

#### *Υπερηχογράφημα οσχέου*

Το υπερηχογράφημα οσχέου (US) μπορεί να είναι χρήσιμο για: (1) τη μέτρηση του όγκου των όρχεων, (2) την αξιολόγηση της δομής, της θέσης και της μορφολογίας των όρχεων και της επιδιδυμίδας, (3) την έγκαιρη διάγνωση νεοπλασιών του όρχεως οι οποίες είναι πιο συχνές στους αζωοσπερμικούς άνδρες (1 στους 200, ενώ η συχνότητα στο γενικό πληθυσμό είναι 1 στους 20.000), (4) διάγνωση της κισσοκήλης με την εκτίμηση της φλεβικής παλινδρόμησης και της διαμέτρου των φλεβών (3), (5) την εύρεση έμμεσων σημείων απόφραξης (π.χ., διάταση του ορχικού δικτύου, διευρυμένη επιδιδυμίδα με κυστικές βλάβες, ή απουσία σπερματικού πόρου) και την (6) ανάδειξη φλεγμονωδών καταστάσεων (επιδιδυμίτιδα, ορχίτιδα), υδροκήλης, κακώσεων, αποτιτανώσεων όρχεως (3). Στην κλινική πρακτική, ο όγκος των όρχεων που προέρχεται από ορχιδόμετρο Prader θεωρείται αξιόπιστο υποκατάστατο του όγκου όρχεων που μετριέται στο US, είναι πιο εύκολο να εκτελεστεί (221).

#### *Διορθικό υπερηχογράφημα (TRUS)*

Σε άντρες με χαμηλό όγκο σπέρματος, όξινο pH, βαριά ολιγοσπερμία ή αζωοσπερμία και υποψία απόφραξης, το US οσχέου και το TRUS συμβάλλουν στην διάγνωση της CBAVD. Ομοίως, το TRUS διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εκτίμηση της αποφρακτικής αζωοσπερμίας (OA) που οφείλεται στην CBAVD ή ανωμαλιών που σχετίζονται με την απόφραξη των εκσπερματιστικών πόρων. Επίσης μπορεί να απεικονίσει παθήσεις του προστάτη, ιδιαίτερα όταν υπάρχουν ευρήματα από την ψηλάφηση του (3, 253).





## **Αζωοσπερμία**

Η αζωοσπερμία είναι μία από τις πιο σοβαρές μορφές ανδρικής υπογονιμότητας και χαρακτηρίζεται από την πλήρη απουσία σπερματοζωαρίων από το εκσπερμάτισμα, ακόμα και μετά από φυγοκέντρηση δύο διαφορετικών δειγμάτων σπέρματος. Στην αζωοσπερμία, η ανάλυση σπέρματος παρουσιάζει φυσιολογικό όγκο εκσπερμάτισης αλλά απουσία σπερματοζωαρίων μετά από φυγοκέντρηση. Η μέθοδος που συνίσταται είναι αρχικά η φυγοκέντρηση του σπέρματος στις 3.000 στροφές για 15 λεπτά και ακολούθως μια λεπτομερής μικροσκοπική εξέταση με μικροσκόπιο αντίθετης φάσης σε μεγέθυνση  $\times 200$ . Από αζωοσπερμία πάσχει περίπου το 1-2% των ανδρών του γενικού πληθυσμού και το 10-15% των υπογόνιμων ανδρών (254, 255).

Η αζωοσπερμία διακρίνεται σε αποφρακτική και μη αποφρακτική. Η αποφρακτική αζωοσπερμία (OA) οφείλεται σε απόφραξη της εκφορητικής οδού του σπέρματος από τους όρχεις έως την ουρήθρα. Η απόφραξη μπορεί να είναι συγγενής ή επίκτητη σε οποιοδήποτε σημείο κατά μήκος του ανδρικού γεννητικού συστήματος από τον όρχι έως την ουρήθρα (256). Η αποφρακτική αζωοσπερμία αφορά περίπου το 20-40% των αζωοσπερμικών ανδρών (257, 258). Οι άνδρες αυτοί χαρακτηρίζονται από φυσιολογική FSH, φυσιολογικό μέγεθος όρχεων και πιθανόν διογκωμένες ή/και με σκληρία επιδιδυμίδες (16).

Η μη αποφρακτική αζωοσπερμία (NOA) είναι συχνότερη και προκαλείται από ορχική ανεπάρκεια (δηλαδή αποτυχία παραγωγής σπερματοζωαρίων στους όρχεις). Ευτυχώς, σε ορισμένους από αυτούς τους άνδρες μπορεί να βρεθούν εστίες ενεργούς σπερματογένεσης μέχρι το στάδιο του απλοειδούς γαμέτη (259).

Η παρουσία λιγότερων από 1.000 σπερματοζωαρίων/mL στο εκσπερμάτισμα μετά από φυγοκέντρηση, ενώ κανένα δεν φαίνεται στην αρχική αξιολόγηση ονομάζεται «κρυπτοζωοσπερμία». Οι ασθενείς με κρυπτοζωοσπερμία μπορούν να διαγνωστούν παροδικά ως αζωοσπερμία, πράγμα που σημαίνει ότι μόνο μερικά ώριμα σπερματοζωάρια μπορούν να βρεθούν στο εκσπερματισμά τους. Αυτό πιθανότατα οφείλεται σε μεταβλητή σπερματογένεση σε ορισμένες περιπτώσεις NOA (260). Επίσης, είναι πολύ σημαντικό να προσδιοριστεί εάν υπάρχει μερική απόφραξη (ως μερική απόφραξη του αγωγού εκσπερμάτωσης [EDO]), καθώς μπορεί να προκληθεί σοβαρή ολιγοσπερμία ή ολιγοασθενοτεροσπερμία (261). Επομένως, η κρυπτοζωοσπερμία μπορεί να αντιπροσωπεύει μια φάση κοντά στο τέλος ενός φάσματος και για τους δύο τύπους αζωοσπερμίας που ξεκινά με την ολιγοσπερμία.

## Αποφρακτική αζωοσπερμία

### *Ενδοορχική απόφραξη*

Η ενδοορχική απόφραξη εμφανίζεται στο 15% των ανδρών με ΟΑ. Οι συγγενείς μορφές χαρακτηρίζονται από απουσία επικοινωνίας ευθέων σωληναρίων με την κεφαλή της επιδιδυμίδας και είναι λιγότερο συχνές από τις επίκτητες μορφές (μεταφλεγμονώδεις ή μετατραυματικές) (262).

### *Απόφραξη της επιδιδυμίδας*

Η επιδιδυμική απόφραξη είναι η πιο συχνή αιτία της ΟΑ, επηρεάζοντας το 30-67% των αζωοσπερμικών ανδρών (262-265). Η συγγενής επιδιδυμική απόφραξη μπορεί να εκδηλωθεί στα πλαίσια της συγγενούς αμφοτερόπλευρης απουσίας του σπερματικού πόρου (CBAVD) που συνήθως συνοδεύεται από μεταλλάξεις στο γονίδιο του ρυθμιστή της διαμεμβρανικής αγωγιμότητας της κυστικής ίνωσης (CFTR), που θα οδηγήσει σε απουσία του σπερματικού πόρου και μερική ή ολική απουσία της επιδιδυμίδας (265). Άλλες συγγενείς μορφές επιδιδυμικής απόφραξης περιλαμβάνουν το σύνδρομο Young (συγγενείς βρογχεκτασίες και υποτροπιάζουσες αναπνευστικές λοιμώξεις) (266). Η επίκτητη απόφραξη μπορεί να είναι αποτέλεσμα οξείας (π.χ., γονοκοκκική) ή υποκλινικής (π.χ. χλαμύδια) επιδιδυμίτιδας (267-269). Άλλες αιτίες μπορεί να είναι το τραύμα ή χειρουργική επέμβαση (269, 270). Η ιατρογενής απόφραξη της επιδιδυμίδας μπορεί να επιπλοκή της χειρουργικής αποκατάστασης της υδροκήλης, διαδερμική/μικροχειρουργική αναρρόφηση επιδιδυμικού σπέρματος (PESA / MESA) (12, 271).

### *Απόφραξη του σπερματικού πόρου*

Η απόφραξη του σπερματικού πόρου είναι η πιο συχνή αιτία επίκτητης απόφραξης μετά από βασηκτομή (267). Η απόφραξη του σπερματικού πόρου μπορεί να είναι αποτέλεσμα ιατρογενών κακώσεων μετά την πλαστική αποκατάσταση της βουβωνοκήλης, της σπερματοκήλης και της υδροκήλης (272, 273). Η πιο συχνή συγγενής ΟΑ μπορεί να οφείλεται σε CBAVD που οδηγεί σε απουσία του σπερματικού πόρου και των άνω 2/3 της επιδιδυμίδας (274).

### *Απόφραξη των εκσπερματιστικών πόρων*

Η απόφραξη των εκσπερματιστικών πόρων παρατηρείται στο 1-5% των περιπτώσεων ΟΑ και οφείλεται σε συγγενή αίτια (κύστεις που πιέζουν το άνοιγμα των εκσπερματιστικών πόρων στην ουρήθρα) (275) ή επίκτητα μεταφλεγμονώδη (οξεία, μη οξεία και χρόνια ουρηθρο-προστατίτιδα) (276). Η απόφραξη των εκσπερματιστικών πόρων συνήθως χαρακτηρίζεται από χαμηλό όγκο σπέρματος, μειωμένη ή απύσα φρουκτόζη σπέρματος και όξινο pH. Οι σπερματοδόχες κύστεις και ο εκσπερματιστικός πόρος συνήθως είναι διατεταμένοι (275-278).

Η αμφοτερόπλευρη απόφραξη του εκσπερματιστικού πόρου και η συγγενής απουσία του σπερματικού πόρου θα είχαν ως αποτέλεσμα την εκσπερμάτιση μικρού όγκου σπέρματος. Σε αυτή την περίπτωση θα πρέπει να γίνει διαφορική διάγνωση από διαταραχές της εκσπερμάτισης όπως παλίνδρομη εκσπερμάτιση (διαβητική, φαρμακολογική, ή χειρουργική συμπαθητεκτομή) ή περιπτώσεις τραυματισμού του νωτιαίου μυελού (279, 280).

### *Χειρουργική αντιμετώπιση της αποφρακτικής αζωοσπερμίας*

Οι άνδρες με αποφρακτική αζωοσπερμία μπορούν να γίνουν γόνιμοι ξανά με τη βοήθεια ορισμένων χειρουργικών επεμβάσεων που έχουν ως σκοπό την αποκατάσταση της βατότητας της αποχετευτικής οδού του σπέρματος. Όταν υπάρχει απόφραξη του σπερματικού πόρου ή της επιδιδυμίδας μπορούν να υποβληθούν σε χειρουργικές αναστομωτικές επεμβάσεις όπως είναι η αναστόμωση του σπερματικού πόρου (vasovasostomy, VV) και η επιδιδυμοσπερματική αναστόμωση (vasoepididymostomy, VE) αντίστοιχα. Στην επιδιδυμοσπερματική αναστόμωση παρακάμπτεται το σημείο της απόφραξης της επιδιδυμίδας (συνήθως στην ουρά της) και γίνεται αναστόμωση της κεφαλής της επιδιδυμίδας με τον σπερματικό πόρο.

Σε έμπειρα χέρια, η επανορθωτική χειρουργική επέμβαση της ανδρικής αναπαραγωγικής οδού μπορεί να είναι εξαιρετικά επιτυχής. Οι μικροχειρουργικές τεχνικές έχουν παρουσιάσει καλύτερα αποτελέσματα (281, 282). Η αποκατάσταση της βατότητας μετά από την χειρουργική επέμβαση κυμαίνεται από 3 έως 18 μήνες, και ο μέσος χρόνος που απαιτείται για να επιτευχθεί κύηση είναι ένα έτος (283). Μετά τη μικροχειρουργική επέμβαση, το 50-95% των ασθενών θα έχουν σπερματοζώαρια στην εκσπερμάτιση, ενώ το 30-75% των ζευγαριών θα επιτύχουν εγκυμοσύνη χωρίς την ανάγκη τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (281, 282).

Η επιτυχία των αναστομοτικών τεχνικών βασίζεται στην ακριβή προσέγγιση των βλεννογόνων, στην καλή παροχή αίματος, στη δημιουργία στεγανής αναστόμωσης, και στη χρήση ελάχιστα τραυματικής αναστομοτικής τεχνικής. Η πιο συχνή επιπλοκή είναι το αιμάτωμα και στις απώτερες επιπλοκές συμπεριλαμβάνεται το σπερματικό κοκκίωμα στη θέση της αναστόμωσης, η στένωση και η απόφραξη.

Ως θεραπεία της απόφραξης των εκσπερματιστικών πόρων θεωρείται η διουρηθρική εκτομή αυτών (TURED). Πραγματοποιείται εκτομή του προστάτη στο ύψος του σπερματικού λοφιδίου είτε για να ανοίξει ένας στενωμένος εκσπερματιστικός πόρος είτε για να αποκαλυφθεί μια κύστη (275, 276).

Όσοι έχουν συγγενή στένωση των εκσπερματιστικών πόρων έχουν καλύτερη πρόγνωση, με 100% βελτίωση στις παραμέτρους του σπέρματος (κινητικότητα και όγκος), 83% βελτίωση στον αριθμό των σπερματοζωαρίων και 66% επιτυχημένο ποσοστό εγκυμοσύνης. Ωστόσο, από τους άνδρες με επίκτητη απόφραξη των εκσπερματιστικών πόρων, μόνο το 37,5% παρατήρησε βελτίωση στις παραμέτρους του σπέρματος τους και μόνο το 12,5% από αυτούς είχαν επιτυχημένη εγκυμοσύνη (261).

Οι επιπλοκές της εκτομής είναι τα ερεθιστικά συμπτώματα από το ουροποιογεννητικό λόγω παλινδρόμησης ούρων εντός του σπερματικού πόρου, η ακράτεια ούρων από τραυματισμό του έξω σφικτήρα, η αιμοσπερμία, η επιδιδυμίτιδα και η παλινδρόμηση του σπέρματος (284).

Τεχνικές ανάκτησης σπέρματος στην αποφρακτική αζωοσπερμία εφαρμόζονται είτε συμπληρωματικά των επανορθωτικών τεχνικών είτε όταν η χειρουργική αποκατάσταση είναι αδύνατη και το ζευγάρι προτιμά να προχωρήσει σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

#### Μη αποφρακτική αζωοσπερμία

Η μη αποφρακτική αζωοσπερμία (NOA) ορίζεται ως η απουσία σπέρματος στην ανάλυση σπέρματος μετά από φυγοκέντρηση, με συνήθως φυσιολογικό όγκο εκσπερμάτισης. Χρήζει επιβεβαίωσης σε τουλάχιστον δύο διαδοχικές αναλύσεις σπέρματος (222).

Η αδυναμία παραγωγής ή η ελάχιστη παραγωγή σπερματοζωαρίων υποδηλώνει ορχική ανεπάρκεια ή μπορεί να σχετίζεται με δυσλειτουργία του άξονα υποθάλαμου-υπόφυσης-όρχεως (HPG) (13).

**Πίνακας 3. Αίτια της μη αποφρακτικής αζωοσπερμίας**

Παράγοντας	Αιτιολογία
Συγγενή	Ανορχία
	Ορχική δυσγενεσία/κρυπορχία
	Γενετικές διαταραχές (καρυότυπος, μικροελλείψεις χρωμοσώματος Y)
Επίκτητα	Τραύμα
	Συστροφία όρχεως
	Φλεγμονές, ιδιαίτερα μετά από παρωτιδική ορχίτιδα
	Εξωγενείς παράγοντες (φάρμακα, κυτταροτοξικά, αναβολικά, ακτινοβολία, θερμότητα)
	Συστηματική νόσος (κίρρωση ήπατος, νεφρική ανεπάρκεια)
	Νεοπλασία όρχεως
	Κιρσοκήλη
	Χειρουργική επέμβαση που επηρεάζει την αγγείωση του όρχεως και οδηγεί σε ορχική ατροφία
Ιδιοπαθής	Άγνωστη αιτιολογία
	Άγνωστη παθογένεια

**Διερεύνηση της μη αποφρακτικής αζωοσπερμίας**

Η διάγνωση του NOA βασίζεται σε δύο διαδοχικές αναλύσεις σπέρματος που επιβεβαιώνουν την αζωοσπερμία. Στην μη αποφρακτική αζωοσπερμία (NOA), η ανάλυση σπέρματος δείχνει φυσιολογικό όγκο εκσπερμάτισης και αζωοσπερμία μετά από φυγοκέντρηση. Η φυγοκέντρηση του σπέρματος γίνεται στις 3000 στροφές για δεκαπέντε λεπτά και στη συνέχεια ακολουθεί μια λεπτομερής μικροσκοπική εξέταση του ιζήματος με μικροσκόπιο αντίθετης φάσης σε μεγέθυνση  $\times 200$ . Όλα τα δείγματα μπορεί να βαφούν και να επανεξεταστούν μικροσκοπικά (222).

Επίσης θα πρέπει να αποκλειστούν οι αιτίες της OA. Οι ασθενείς με NOA θα πρέπει να υποβληθούν σε μια προσεκτική και ενδελεχή ανδρολογική εξέταση με στόχο να εντοπιστούν γενετικά κληρονομούμενες διαταραχές, πιθανές θεραπεύσιμες αιτίες αζωοσπερμίας και πιθανές συννοσηρότητες. Ακρογωνιαίος λίθος της διάγνωσης είναι ένα λεπτομερές ιατρικό ιστορικό (π.χ. ιστορικό κρυπορχίας, προηγηθείσα γοναδοτοξική θεραπεία για καρκίνο), που συμπληρώνεται με μια πλήρη φυσική εξέταση για την ανίχνευση καταστάσεων που ενδέχεται να οδηγήσουν σε αζωοσπερμία (285).

Έχει παρατηρηθεί ότι η NOA μπορεί να είναι η πρώτη εκδήλωση σε ασθενείς με όγκο της υπόφυσης ή όγκο των όρχεων από γεννητικά κύτταρα (286-288). Έχει αποδειχθεί ότι οι ασθενείς με NOA διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο διάγνωσης καρκίνου (289). Επιπλέον, άλλες συστηματικές καταστάσεις όπως το μεταβολικό σύνδρομο, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, η οστεοπόρωση και οι καρδιαγγειακές παθήσεις παρατηρούνται συχνότερα σε ασθενείς με NOA σε σύγκριση με άνδρες με φυσιολογικό σπερμοδιάγραμμα (290-292).

Οι ασθενείς με NOA θα πρέπει να υποβληθούν σε πλήρη ορμονικό έλεγχο για να αποκλειστεί συνυπάρχον υπογοναδισμός, ο οποίος έχει βρεθεί σε περίπου 30% των ασθενών με NOA (293-295). Σε άνδρες με ορχική ανεπάρκεια, ο υπεργοναδοτροπικός υπογοναδισμός είναι συνήθως παρών, με υψηλά επίπεδα της FSH και της LH, με ή χωρίς χαμηλά επίπεδα της τεστοστερόνης. Ο σωστός διαχωρισμός του τύπου του υπογοναδισμού είναι θεμελιώδους σημασίας για τη διαγνωστική και θεραπευτική προσέγγιση του ασθενούς (296).

Οι άνδρες με NOA θα πρέπει να υποβάλλονται σε γενετική ανάλυση για την ανίχνευση γενετικών ανωμαλιών. Οι ασθενείς αυτοί θα πρέπει να υποβληθούν σε ανάλυση καρυότυπου (233, 297) μαζί με εξέταση μικροελλείψεων του χρωμοσώματος Y (251, 298) και του γονιδίου που κωδικοποιεί το CFTR προκειμένου να αποκλειστούν οι ταυτόχρονες μεταλλάξεις και να αποκλειστεί η CBAVD (299, 300). Η γενετική συμβουλευτική θα πρέπει να παρέχεται σε ζευγάρια.

Το υπερηχογράφημα οσχέου είναι χρήσιμο για την ανεύρεση σημείων απόφραξης, σημείων δυσγενεσίας των όρχεων και νεοπλασιών των όρχεων. Σε ασθενείς με χαμηλό όγκο σπέρματος και για τους οποίους υπάρχει υποψία απομακρυσμένης απόφραξης, είναι απαραίτητο το διορθικό υπερηχογράφημα (3).

#### Χειρουργική αντιμετώπιση της μη αποφρακτικής αζωοσπερμίας

Η χειρουργική θεραπεία για NOA στοχεύει κυρίως στην ανάκτηση σπέρματοζωαρίων απευθείας από τους όρχεις. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται ως μέρος των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART) και συγκεκριμένα ως μέρος της μικρογονιμοποίησης (intracytoplasmic sperm injection ή ICSI). Η σπερματογένεση μπορεί να είναι εστιακή, πράγμα που σημαίνει ότι σε περίπου 50% των ανδρών με NOA τα σπερματοζωάρια μπορούν να βρεθούν και να χρησιμοποιηθούν για ICSI (301, 302).

## Διαγνωστική βιοψία όρχεως

Η διαγνωστική βιοψία όρχεως (DTB) αποτελούσε για πολλά χρόνια τον ακρογωνιαίο λίθο της διάγνωσης της ανδρικής υπογονιμότητας σε άνδρες με ανεξήγητη υπογονιμότητα και αζωοσπερμία. Οι πρόσφατες κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ουρολογικής Εταιρίας που αφορούν την ανδρική υπογονιμότητα έχουν περιορίσει τις ενδείξεις της DTB (224).

Από ανεξήγητη ανδρική υπογονιμότητα πάσχει περίπου το 30-40% των ανδρών με μη φυσιολογικές παραμέτρους σπέρματος (221). Η DTB μπορεί να αποτελεί μέρος της διαγνωστικής διερεύνησης στειρών ανδρών, αλλά συνήθως η ιστοπαθολογική εξέταση των όρχεων δεν εξηγεί την πραγματική αιτία της υπογονιμότητας. Απλώς επιβεβαιώνει μια διαταραχή της σπερματογένεσης σε άνδρες με χαμηλές συγκεντρώσεις σπερματοζωαρίων και αυξημένη FSH. Η DTB συμβάλει στην διαφορική διάγνωση μεταξύ της αποφρακτικής και μη αποφρακτικής αζωοσπερμίας.

Σήμερα, η DTB πραγματοποιείται ταυτόχρονα με την θεραπευτική βιοψία όρχεως (TTB) με σκοπό την ανάκτηση σπερματοζωαρίων που θα χρησιμοποιηθούν σε τεχνικές εξωσωματικής γονιμοποίησης. Σε άνδρες με NOA ή ολιγοσπερμία η ενδοωαριακή ένεση σπερματοζωαρίων (ICSI) είναι η μόνη λύση εάν υπάρχουν βιώσιμα σπερματοζωάρια (303). Σε περίπου 50-60% των ανδρών με NOA και στο 100% των ανδρών με OA, τα σπερματοζωάρια μπορούν να ανακτηθούν από τους όρχεις και να χρησιμοποιηθούν για ICSI (304). Εφόσον στην OA παρατηρείται φυσιολογική σπερματογένεση στην DTB, η χειρουργική αποκατάσταση του γεννητικού συστήματος μπορεί να είναι εφικτή και να οδηγήσει στην παρουσία σημαντικού αριθμού σπερματοζωαρίων στο εκσπερμάτισμα και αυθόρμητες εγκυμοσύνες. Ωστόσο στις περισσότερες περιπτώσεις η DTB δεν θα αλλάξει τις θεραπευτικές επιλογές (224).

Ενδείξεις διαγνωστικής βιοψίας όρχεως

Θα πρέπει να ληφθούν υπόψη οι ακόλουθες ενδείξεις για DTB:

### 1. Αποφρακτική αζωοσπερμία (OA):

Σε άνδρες με OA μπορεί να είναι επιθυμητή η επιβεβαίωση της φυσιολογικής σπερματογένεσης προτού προγραμματιστεί η χειρουργική αποκατάσταση του γεννητικού συστήματος. Αυτό δεν ισχύει για άνδρες με ιστορικό βασεκτομής ή για άνδρες με συγγενή απουσία του σπερματικού πόρου, εκτός κι εάν έχει μειωθεί ο όγκος των όρχεων ή έχει αυξηθεί η FSH (295).

## 2. Σε συνδυασμό με την θεραπευτική βιοψία όρχεως TTB:

Η TTB πραγματοποιείται για τη λήψη σπερματοζωαρίων από τους όρχεις με σκοπό να χρησιμοποιηθούν σε μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART) (305). Θα πρέπει να αποστέλλεται ορχικός ιστός για ιστοπαθολογική εξέταση (DTB) ώστε να προσδιοριστεί η ορχική βλάβη και να πραγματοποιηθεί έλεγχος για νεοπλασία (306).

## 3. Διάγνωση ενδοσωληνιακής νεοπλασίας από γεννητικά κύτταρα:

Η ενδοσωληνιακή νεοπλασία από γεννητικά κύτταρα αταξινόμητου τύπου (ITGCNU), με παλαιότερη ονομασία ως καρκίνωμα *in situ*, αποτελεί την πρόδρομη βλάβη όλων των όγκων του όρχεως (εξαιρέση το σπερματοκυτταρικό καρκίνωμα). Οι παράγοντες κινδύνου για ITGCNU είναι η ανδρική υπογονιμότητα μαζί με άλλους παράγοντες κινδύνου, όπως ιστορικό κρυσορχίας, ιστορικό νεοπλασίας όρχεων από γεννητικά κύτταρα και στην περίπτωση ιδιοπαθούς ορχικής ατροφίας. Επίσης, ορισμένα υπερηχογραφικά ευρήματα των όρχεων υποδηλώνουν την πιθανή παρουσία ITGCNU, ειδικά η μικρολιθίαση όρχεων και η ανομοιογένεια του παρεγχύματος. Ύποπτες αλλοιώσεις των όρχεων άγνωστης προέλευσης απαιτούν βιοψία εκτομής (307-311).

### Προγνωστική αξία της DTB

Σε άνδρες με NOA, μπορεί να πραγματοποιηθεί ανάκτηση σπερματοζωαρίων από τους όρχεις στο 50-60% (304). Προηγούμενες προσπάθειες πρόβλεψης της επιτυχούς ανάκτησης σπερματοζωαρίων από τους όρχεις ανδρών με NOA με βάση κλινικές παραμέτρους, όπως ο όγκος των όρχεων ή οι αναπαραγωγικές ορμόνες έχουν αποτύχει. Στη διεθνή βιβλιογραφία, δεν υπάρχει συναίνεση σχετικά με την αξία της ιστοπαθολογικής εξέτασης των όρχεων για την πρόγνωση επιτυχούς ανάκτησης σπερματοζωαρίων. Ορισμένοι συγγραφείς καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η ιστοπαθολογία των όρχεων έχει περιορισμένη αξία (312), ενώ άλλοι θεωρούν ότι έχει σημαντική προγνωστική αξία (313-315). Η ανάκτηση σπερματοζωαρίων είναι συνήθως καλή σε άνδρες με υποσπερματογένεση και περιορισμένη σε άνδρες με σύνδρομο από κύτταρα Sertoli μόνο (SCOS).



## DTB κατά την ορχεοπηξία

Η κρυπορχία είναι η πιο συχνή συγγενής διαταραχή του ανδρικού γεννητικού συστήματος με συχνότητα 1% στην ηλικία του 1 έτους. Η κρυπορχία σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για ανδρική υπογονιμότητα και όγκους εκ γεννητικών κυττάρων (316-318). Εάν δεν αντιμετωπιστεί κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας θα οδηγήσει σε προοδευτική απώλεια των γεννητικών κυττάρων. Η ορχεοπηξία συνιστάται στην πρόιμη παιδική ηλικία για να βελτιώσει τα μελλοντικά προβλήματα γονιμότητας και να συμβάλει στην έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου του όρχι μέσω της ψηλάφησης του. Σε αγόρια με ιστορικό κρυπορχίας, ο κίνδυνος για ανάπτυξη κακοήθειας όρχεων κυμαίνεται από 2% έως 5%, ανάλογα με την ηλικία της ορχεοπηξίας (319, 320).

Η ενδοσωληναριακή νεοπλασία από γεννητικά κύτταρα αταξινόμητου τύπου (ITGCNU) αποτελεί την πρόδρομη βλάβη όλων των όγκων του όρχεως από γεννητικά κύτταρα. Εξαιρούνται οι προεφηβικοί όγκοι και το σπερματοκυτταρικό καρκίνωμα. Το ITGCNU δημιουργείται κατά τη 12<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης. Παραμένει σε χειμερία νάρκη και ενεργοποιείται στην εφηβεία ή λίγο αργότερα λόγω γενετικών, περιβαλλοντικών και ορμονικών παραγόντων. Στη συνέχεια το ITGCNU επεκτείνεται και σε άλλα σπερματικά σωληνάκια και γίνεται διηθητικό νεόπλασμα (321).

Τα αγόρια που υποβάλλονται σε χειρουργική επέμβαση πριν από την ηλικία των 12 ετών έχουν κίνδυνο 2% να αναπτύξουν όγκο όρχεων μετέπειτα στη ζωή τους. Εάν, ωστόσο, η ορχεοπηξία πραγματοποιηθεί κατά τη διάρκεια ή μετά την εφηβεία, ο κίνδυνος ανάπτυξης όγκου όρχεων είναι 5% (320). Επομένως σε εφήβους με κρυπορχία τη στιγμή της ορχεοπηξίας συνιστάται βιοψία όρχεως από πολλαπλά σημεία για την ανίχνευση ITGCNU των όρχεων (224).

Σε μια ομάδα ασθενών που υποβλήθηκαν σε DTB κατά τη στιγμή της ορχεοπηξίας για την αντιμετώπιση της κρυπορχίας, οι Hadziselimonovic και οι συνεργάτες του (320) παρατήρησαν ότι τα αγόρια με ετερόπλευρη κρυπορχία και Ad σπερματογόνια που εντοπίστηκαν στον ιστό των όρχεων τους είχαν επτά φορές υψηλότερες συγκεντρώσεις σπερματοζωαρίων μετέπειτα στη ζωή σε σύγκριση σε όσους δεν είχαν σπερματογόνια Ad, ανεξάρτητα από την ηλικία της χειρουργικής επιδιόρθωσης. Παρόμοια ευρήματα αναφέρθηκαν σε αγόρια με αμφοτερόπλευρη κρυπορχία. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα αγόρια με κρυπορχία που δεν έχουν σπερματογόνια Ad θα αναπτύξουν υπογονιμότητα παρά την επιτυχή χειρουργική θεραπεία σε οποιαδήποτε ηλικία. Επίσης, καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η DTB κατά τη διάρκεια της ορχεοπηξίας έχει προγνωστική αξία για τη μελλοντική γονιμότητα του άνδρα (322).

### DTB και μη ψηλαφητές διαταραχές όρχεων

Το υπερηχογράφημα οσχέου είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για την αξιολόγηση των όρχεων και των παρακείμενων δομών και χρησιμοποιείται συχνά στη διάγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας. Η χρήση υπερήχων επιτρέπει την ανίχνευση αρκετών ενδο-ορχικών διαταραχών, όπως η μικρολιθίαση και οι μη ψηλαφητές αλλοιώσεις των όρχεων. Και οι δύο καταστάσεις μπορεί να σχετίζονται με καρκίνο των όρχεων (312). Οι ψηλαφητές αλλοιώσεις των όρχεων έχουν υψηλή πιθανότητα να είναι κακοήθεις σε ποσοστό 95%. Οι μη ψηλαφητές αλλοιώσεις μπορεί να υπάρχουν στο ένα τρίτο των υπογόνιμων ανδρών (323). Η αιτιολογία αυτών των βλαβών διαφέρει μεταξύ των μελετών, με κάποιες να αναφέρουν υψηλό ποσοστό κακοήθειας, ενώ άλλες βρήκαν τις βλάβες αυτές καλοήθεις (324-326).

Οι Eifler κ.ά. (323) εξέτασαν συνολικά 145 άνδρες που παρουσίασαν υπογονιμότητα και υποβλήθηκαν σε υπερηχογραφική εξέταση. Μεταξύ αυτών, 49 βρέθηκαν να έχουν διαταραχές στο υπερηχογράφημα. Μόνο ένας ασθενής φάνηκε να έχει σεμίνωμα μεγέθους 10 mm ενώ όλες οι άλλες βλάβες βρέθηκαν να είναι καλοήθεις με μέγεθος που κυμαίνεται από 5 έως 10 mm. Οι Torep κ.ά (327) παρακολούθησαν 46 άνδρες με ορχικές βλάβες και μέση ηλικία 35 ετών με υπερηχογράφημα για 1 έτος. Η μέση διάμετρος της βλάβης ήταν 4,3 mm (εύρος: 1-10 mm). Μεταξύ των 46 ανδρών, 38 ασθενείς εμφάνισαν αύξηση των ενδοορχικών αλλοιώσεων 0,5 mm ετησίως. Τρεις ασθενείς υποβλήθηκαν σε άμεση χειρουργική επέμβαση και πέντε υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση μετά από περίοδο παρακολούθησης με υπερήχους (327).

Οι ενδείξεις για χειρουργική επέμβαση ήταν η αύξηση του μεγέθους σε δύο ασθενείς και η προτίμηση των ασθενών σε έξι. Ένας ασθενής υποβλήθηκε σε ριζική ορχεκτομή για αμιγές σεμίνωμα που εντοπίστηκε λόγω αύξησης του μεγέθους από 3 σε 6 mm μετά από 3 μήνες. Ενώ το παρασκεύασμα επτά ασθενών που υποβλήθηκαν σε ογκεκτομή (μερική ορχεκτομή) ήταν καλοήθεις (327).

Από αυτές τις μελέτες μπορεί να βγει το συμπέρασμα ότι οι ασθενείς με μικρές (λιγότερο από 10 mm) μη ψηλαφητές ενδοορχικές βλάβες που ανιχνεύθηκαν σε υπερήχους κατά την αξιολόγηση της ανδρικής υπογονιμότητας μπορεί να επωφεληθούν από την τακτική παρακολούθηση με υπερήχους. Σε περίπτωση αύξησης των ορχικών αλλοιώσεων ή πρόσθετων παραγόντων κινδύνου για όγκους όρχεων γεννητικών κυττάρων (TGCTs), θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η DTB.

### Ανίχνευση των προκαρκινικών διαταραχών του όρχι

Οι TGCTs είναι οι συχνότεροι κακοήθεις όγκοι στους άνδρες ηλικίας μεταξύ 20–34 ετών (288). Η επιβίωση των συγκεκριμένων ασθενών με TGCT στην Ευρώπη είναι 97% σε 1 έτος και 93% στα 5 χρόνια, που αποτελεί το υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης για κάθε κακοήγη νεοπλασία στους άνδρες (328). Παρά το υψηλό ποσοστό θεραπείας, η ετήσια αύξηση της συχνότητας εμφάνισης περίπου 2 –5% στην Ευρώπη αποτελεί μείζονα παράγοντα ανησυχίας (329). Είκοσι τρία τοις εκατό των ανδρών που παρουσιάζουν TGCT έχουν μεταστάσεις και χρειάζονται ακτινοθεραπεία ή χημειοθεραπεία με δυνητικά σοβαρές επιπτώσεις, συμπεριλαμβανομένης της υπογονιμότητας. Τα TGCT, συμπεριλαμβάνουν τους σεμινωματώδεις και τους μη σεμινωματώδεις όγκους, έχουν τη ITGCNU ως κοινή πρόδρομη προ-καρκινική βλάβη (330). Η ITGCNU εξελίσσεται σε επεμβατική κακοήθεια στο 70% των περιπτώσεων σε 7 χρόνια και πιθανώς σε όλους τους ασθενείς για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (331). Η ITGCNU μπορεί να αντιμετωπιστεί επιτυχώς με χαμηλή δόση ακτινοθεραπείας ή ετερόπλευρης ορχεκτομής. Η ακτινοθεραπεία ή η ορχεκτομή αποτρέπει την εξέλιξη από της ITGCNU σε ένα επεμβατικό TGCT και είναι πιθανό να θεραπεύσει τον ασθενή (331). Αυτό οδηγεί στην αποφυγή της επικουρικής χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας και τον κίνδυνο εμφάνισης μακροχρόνιων επιπλοκών. Μετά τη χημειοθεραπεία για καρκίνο των γεννητικών κυττάρων των όρχεων, υπάρχει αυξημένος κίνδυνος καρδιαγγειακών παθήσεων, πνευμονικής ίνωσης, νεφροτοξικότητας και δευτεροπαθών κακοηθειών.

Επομένως θα πρέπει να δοθεί βάση στην πρόωμη διάγνωση ενός μη διηθητικού καρκινώματος. Η προ-καρκινική αυτή κατάσταση αυτή διαγιγνώσκεται μέσω της DTB. Το ποσοστό των ψευδώς αρνητικών βιοψιών εκτιμάται τόσο χαμηλό όσο 0,5%. Αυτό υποτίθεται ότι οφείλεται στην ίση κατανομή της ITGCNU σε όλους τους όρχεις. Ωστόσο, ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών και αναφορών περιπτώσεων δείχνουν ότι η ITGCNU μπορεί επίσης να υπάρχει ως εστιακή βλάβη στους όρχεις και μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητική βιοψία (288, 332).

Από όλους τους ασθενείς με ιστορικό κακοήθειας εκ γεννητικών κυττάρων όρχεως, περίπου 2% -5% φέρουν ITGCNU στον ετερόπλευρο όρχι που θα εξελιχθεί σε διηθητικό όγκο γενετικών κυττάρων με την πάροδο του χρόνου. Στην επιστημονική κοινότητα υπάρχει διχογνωμία εάν πρέπει να πραγματοποιείται DTB του ετερόπλευρου όρχι ως εξέταση ρουτίνας σε όλους τους άνδρες που έχουν διαγνωστεί με καρκίνο των όρχεων,

καθώς θα πρέπει να προσφέρεται μόνο εάν παρέχει σαφές όφελος για την υγεία του ασθενούς. Η θεραπεία της ITGCNU στον ετερόπλευρο όρχι θα οδηγήσει σε μη αναστρέψιμη υπογονιμότητα και σε περίπου 20% περιπτώσεις, θα προκαλέσει επίσης υπογοναδισμό. Μια εναλλακτική λύση θα μπορούσε να είναι η ενεργός παρακολούθηση για άνδρες που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία για TGCTs. Σύμφωνα με τις συστάσεις της ευρωπαϊκής ομάδας συναίνεσης του καρκίνου των γεννητικών κυττάρων, [European Germ Cell Cancer Consensus Group (EGCCCG)] δεν συστήνεται DTB ως εξέταση ρουτίνας στον ετερόπλευρο όρχι. Μπορεί να προσφερθεί βιοψία όρχεων σε υψηλού κινδύνου ασθενείς για την ανίχνευση ετερόπλευρης ITGCNU, δηλαδή σε ασθενείς με όγκο όρχεων μικρότερο από 12 ml, άνδρες με ιστορικό κρυπορχίας και πτωχή σπερματογένεση (333, 334).

Η μη επεμβατική εξέταση για την ανίχνευση της ITGCNU των όρχεων μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα ανίχνευσης ανδρών με αυξημένο κίνδυνο TGCTs (311, 335). 38,67 Αυτό ισχύει για άνδρες με υπογονιμότητα, ιστορικό κρυπορχίας και όγκου όρχεων και για άτομα με ατροφία όρχεως. Πρόσφατα, οι van Casteren κ.ά. (336) πρότειναν έναν νέο αλγόριθμο για τη διαχείριση ασθενών με μικρολιθίαση όρχεων.

Η DTB θα πρέπει να εφαρμοσθεί σε υπογόνιμους άνδρες με μικρολιθίαση των όρχεων, οι οποίοι ανήκουν σε μία από τις ακόλουθες ομάδες υψηλού κινδύνου: σπερματογενετική ανεπάρκεια (υπογονιμότητα), αμφοτερόπλευρη μικρολιθίαση όρχεων, ατροφικοί όρχεις (λιγότερο από 12 mL), ιστορικό κρυπορχίας και TGCT. Εάν δεν υπάρχει κανένας από αυτούς τους παράγοντες κινδύνου, αρκεί η αυτοεξέταση. Οι άνδρες με TM πρέπει να πραγματοποιούν αυτοεξέταση ακόμη και χωρίς πρόσθετους παράγοντες κινδύνου, καθώς αυτό μπορεί να οδηγήσει σε έγκαιρη ανίχνευση TGCT.

#### Διαχείριση του ορχικού ιστού στην DTB

Πολύ συχνά στην κλινική πράξη, η αξία της βιοψίας των όρχεων μειώνεται ως αποτέλεσμα της κακής διαχείρισης των δειγμάτων του ορχικού ιστού και της εσφαλμένης εκτίμησης αυτών από παθολογοανατόμους, που δεν είναι πλήρως εξοικειωμένοι με την ιστολογία της αναπαραγωγικής οδού.

Η στερέωση του δείγματος είναι σημαντική καθώς μπορεί να επηρεάσει τα μοτίβα χρώσης. Είναι επιθυμητή μια τυποποιημένη προσέγγιση για τη σταθεροποίηση και τη χρώση του δείγματος (337-339). Η ευρωπαϊκή ομάδα συναίνεσης του καρκίνου των γεννητικών κυττάρων υποστηρίζει τη χρήση του διαλύματος Stieve's ή Bouin για

μονιμοποίηση (333). Η χρήση του διαλύματος Stieve μπορεί να βοηθήσει στην προφύλαξη της μορφολογίας, αλλά παρεμποδίζει τις μεθόδους ενδοπυρηνικής χρώσης εάν η διαδικασία μονιμοποίησης παραταθεί. Το διάλυμα Bouin επιτρέπει την καλή μονιμοποίηση του ιστού για ιστολογική αξιολόγηση της σπερματογένεσης και χρησιμοποιείται συχνά λόγω της μειωμένης διάρκειας ζωής και της τοξικότητάς του (340). Η φορμαλίνη χρησιμοποιείται συνήθως για μονιμοποίηση, αλλά μπορεί να προκαλέσει τεχνήματα.

Συνήθως, η χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης εφαρμόζεται συνήθως για την αξιολόγηση της σπερματογένεσης. Για την ανίχνευση της ITGCNU των όρχεων, συνιστώνται πρόσθετες διαδικασίες χρώσης (341). Η ITGCNU είναι δύσκολο να εντοπιστεί στις βιοψίες των όρχεων. Έχουν αναπτυχθεί αρκετοί δείκτες για την ανίχνευση της ITGCNU των όρχεων, όπως η αλκαλική φωσφατάση πλακούντα, η AP2-γάμμα και ο υποδοχέας βλαστικών κυττάρων c-KIT (342).

#### Ιστολογικά πρότυπα σπερματογένεσης στην DTB

Περιγράφονται αρκετά συστήματα ταξινόμησης, (343-346) όλα είναι βασισμένα σε πέντε βασικά ιστολογικά πρότυπα της σπερματογένεσης: (1) απουσία σπερματικών σωληναρίων (υαλοειδοποίηση), (2) απουσία γεννητικών κυττάρων εντός των σπερματικών σωληναρίων (σύνδρομο από κύτταρα Sertoli μόνο, SCOS), (3) αναστολή της ωρίμανσης ή σπερματογενετική στάση (ατελής σπερματογένεση, απουσία ωρίμανσης πέραν του σταδίου του σπερματογονίου ή του σπερματοκυττάρου), (4) υποσπερματογένεση (όλες οι μορφές κυττάρων έως και τις ώριμες σπερματίδες/σπερματοζωάρια αναγνωρίζονται, αλλά, αλλά υπάρχει μια σαφής μείωση του αριθμού των γεννητικών κυττάρων και (5) φυσιολογική σπερματογένεση. Στην κλινική πράξη, τα διαφορετικά στάδια της σπερματογένεσης υπάρχουν συχνά το ένα δίπλα στο άλλο σε μία μόνο βιοψία (μικτό μοτίβο). Αυτό είχε ως αποτέλεσμα μια ευρεία διαφοροποίηση της ταξινόμησης της σπερματογένεσης από διαφορετικούς παθολογοανατόμους και περιορίζει τη διαγνωστική και προγνωστική αξία της DTB.

#### Φυσιολογική σπερματογένεση

Πάνω από το 85% του όγκου των όρχεων αποτελείται από τα σπερματικά σωληνάκια τα οποία αποτελούνται από τα γεννητικά κύτταρα σε διάφορα στάδια ωρίμανσης και τα υποστηρικτικά τους κύτταρα Sertoli. Τα αιμοφόρα αγγεία και τα κύτταρα Leydig στον

ενδιάμεσο χώρο αποτελούν το υπόλοιπο κυτταρικό στοιχείο. Η σπερματογένεση προχωρά με ομαλό τρόπο από τα σπερματογόνια κατά μήκος της βασικής μεμβράνης στα σπερματοκύτταρα και τελικά στα ώριμα σπερματοζώαρια κοντά στον αυλό.

Στο περιβάλλον της αζωοσπερμίας, μια φυσιολογική βιοψία όρχεων θεωρείται παθολογική της απόφραξη του πόρου. Παρόλο που εστιακές περιοχές υποσπερματογένεσης και διακοπής ωρίμανσης έχουν παρατηρηθεί παρουσία απόφραξης, ιδιαίτερα στο περιβάλλον προηγούμενης βασηκτομής, αυτά δεν είναι κλασικά ευρήματα για απόφραξη (347).

#### Υποσπερματογένεση

Η υποσπερματογένεση είναι η κατάσταση κατά την οποία παρατηρείται ιστολογικά μειωμένος ο αριθμός όλων των γεννητικών κυττάρων, αλλά όλα τα στάδια της σπερματογένεσης παραμένουν παρόντα. Η ανεύρεση ώριμων σπερματίδων στα σπερματικά σωληνάρια συνιστά κομβικό σημείο για την διάγνωση της υποσπερματογένεσης. Στο αυλικό διαμέρισμα παρατηρείται αποφολίδωση πρώιμων και ώριμων σπερματίδων, αλλά και πρώιμων μορφών πρωτογενών σπερματοκυττάρων. Ο βαθμός της μείωσης των γεννητικών κυττάρων καθορίζει εάν ο ασθενής είναι ολιγοσπερμικός ή αζωοσπερμικός. Η υποσπερματογένεση μπορεί να συνοδεύει έκθεση σε γοναδοτοξίνες ή σε υψηλές θερμοκρασίες, την κισσοκήλη ή τον υποθυρεοειδισμό (348).

#### Σπερματογενετική στάση

Η σπερματογενετική στάση είναι η αναστολή της ωρίμανσης του σπερματικού επιθηλίου, στην οποία τα γεννητικά κύτταρα ωριμάζουν μόνο μέχρι ενός σταδίου. (Εικ. 21-7C). Η αναστολή της ωρίμανσης μπορεί να συμβεί στα πρώιμα στάδια της σπερματογένεσης, στο επίπεδο του πρωτογενούς σπερματοκύτταρου έως στα όψιμα στάδια στις στρογγυλές σπερματίδες. Συνήθως η σπερματογενετική στάση γίνεται στο επίπεδο των σπερματογονίων η του πρωτογενούς σπερματοκυττάρου, όπου ευθύνεται το ατελές ζευγάρωμα των χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση. Η πλήρης αναστολή της ωρίμανσης θα προκαλέσει αζωοσπερμία, ενώ οι ασθενείς με ατελή αναστολή της ωρίμανσης μπορεί να παρουσιάσουν σοβαρή ολιγοσπερμία. Η υπόλοιπη αρχιτεκτονική των όρχεων, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων Sertoli και Leydig, καθώς και η βασική μεμβράνη, είναι συνήθως φυσιολογικά (348).

### Απλασία γεννητικών κυττάρων

Η απλασία των γεννητικών κυττάρων, που ονομάζεται επίσης σύνδρομο από κύτταρα Sertoli μόνο (SCOS) χαρακτηρίζεται από σπερματικά σωληναρια επενδύμενα αποκλειστικά και μόνο από κύτταρα Sertoli. Τα διάμεσα κύτταρα, καθώς και τα κύτταρα Sertoli και η βασική μεμβράνη, είναι φυσιολογικά και δεν εξαλείφονται από ίνωση. Η διάγνωση της απλασίας των γεννητικών κυττάρων παρατηρείται σε έναν αζωοσπερμικό ασθενή με μικρού μεγέθους όρχεις και αυξημένα επίπεδα FSH χαρακτηριστικά της πρωτοπαθούς ορχικής ανεπάρκειας. Αν και δεν υπάρχουν τρέχουσες θεραπείες για την συμπλήρωση εκ νέου των όρχεων με γεννητικά κύτταρα, χαμηλά επίπεδα σπερματογένεσης μπορεί να παρατηρηθούν σε άλλες περιοχές των όρχεων. Αυτό αποτελεί τη βάση για τη χρήση της μικροχειρουργικής βιοψίας όρχεως (micro-TESE) για την ανάκτηση σπερματοζωαρίων με τελικό σκοπό την χρήση των σπερματοζωαρίων για ICSI (348).

### Σκλήρυνση/υαλοειδοποίηση σωληναρίων και διάμεση ίνωση

Η πάχυνση της βασικής μεμβράνης, η εκτενής ενδοσωληναριακή και περισωληναριακή υαλοειδοποίηση/σκλήρυνση, και η απουσία τόσο των γεννητικών κυττάρων όσο και των κυττάρων Sertoli είναι χαρακτηριστικά ιστολογικά ευρήματα για τους όρχεις τελικού σταδίου. Πιθανά να συνοδεύονται από ίνωση διάμεσου διαμερίσματος και απώλεια κυττάρων του Leydig. Αυτοί οι ασθενείς θα έχουν αζωοσπερμία με πολύ μικρούς, μαλακούς όρχεις (όγκος 2 έως 3 mL). Αν και αυτό είναι χαρακτηριστικό του συνδρόμου Klinefelter, ορισμένοι ασθενείς ενδέχεται να εξακολουθούν να διατηρούν μικρές εστίες σπερματογένεσης, οι οποίες μπορεί να αναγνωριστούν από τη micro-TESE. Το ιστολογικό αυτό πρότυπο μπορεί να παρατηρηθεί σε περιπτώσεις κρυπορχίας και συστροφής όρχεων (348).

### Αξιολόγηση σπερματογένεσης

Ένα ευρέως γνωστό και αξιόπιστο σύστημα ιστολογικής αξιολόγησης επί πολλά χρόνια είναι η βαθμολογία κατά Johnsen (343). Πραγματοποιείται συνεκτίμηση της κατάστασης του σπερματικού επιθηλίου, των κυττάρων Sertoli, των Leydig και του αγγειακού δικτύου. Σε τουλάχιστον 100 σπερματικά σωληνάκια, το επίπεδο ωρίμανσης των γεννητικών

κυττάρων βαθμολογείται μεταξύ 1 και 10, σύμφωνα με το πιο εξελιγμένο γεννητικό κύτταρο στο σπερματικό σωληνάριο (343). Η συνολική βαθμολογία Johnsen καθορίζεται στη συνέχεια διαιρώντας τη συνολική βαθμολογία με τον αριθμό των αξιολογημένων σωληναρίων.

Βαθμολογία:

- 10 : άψογα σωληνάρια με πλήρη σπερματογένεση
- 9 : πολύ καλά σωληνάρια με πολλά σπερματοζωάρια και ελαφρά αποδιοργάνωση
- 8 : ολίγα μόνον σπερματοζωάρια
- 7: απουσία σπερματοζωαρίων, πολλές σπερματίδες
- 6 : λίγες μόνον σπερματίδες
- 5 : όχι σπερματίδες, πολλά σπερματοκύτταρα
- 4 : ολίγα σπερματοκύτταρα
- 3 : σπερμογόνια μόνον
- 2 : όχι γεννητικά, μόνον Sertoli κύτταρα
- 1 : απουσία και των Sertoli

Τελική ιστολογική έκθεση

Η τελική ιστολογική έκθεση θα πρέπει να περιλαμβάνει:

- Την διάμετρο, τη χροιά, τη σύσταση ιστοτεμαχίου του όρχεως
  - Τον αριθμό των σωληναρίων ανά τομή
  - Την ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση σπερματικού επιθηλίου
  - Την περιγραφή των κυττάρων Sertoli, της βασικής μεμβράνης, των κυττάρων Leydig και του αγγειακού δικτύου.
  - Το συμπέρασμα όπου θα αναφέρονται περιληπτικά τα ευρήματα και score κατά Johnsen.
- Μνεία παρουσίας ή μη σπερματοζωαρίων και σπερματίδων



## Θεραπευτική βιοψία όρχεως

Η υπογονιμότητα επηρεάζει σημαντικό αριθμό ζευγαριών παγκοσμίως με πολλές μελέτες να αναφέρουν ότι περίπου το 15% των ζευγαριών αντιμετωπίζει προβλήματα γονιμότητας (349, 350). Η υπογονιμότητα οφείλεται περίπου στο 50% σε έναν ανδρικό παράγοντα και στο 20% οφείλεται αποκλειστικά στον ανδρικό παράγοντα (351). Στις πιο σοβαρές μορφές υπογονιμότητας που οφείλεται στον ανδρικό παράγοντα, ο άνδρας είναι αζωοσπερμικός, δηλαδή απουσιάζουν σπερματοζωάρια στην ανάλυση σπέρματος ακόμη και μετά από φυγοκέντρηση δύο δειγμάτων με διαφορά τουλάχιστον ένα μήνα. Η επίπτωση της αζωοσπερμίας εκτιμάται ότι είναι 1-2 % στον γενικό πληθυσμό (352) και 15% στους υπογόνιμους άνδρες (8).

Η εφαρμογή της ενδοωαριακής ένεσης σπερματοζωαρίων (ICSI), άλλαξε ριζικά το χαρακτήρα της θεραπείας της ανδρικής υπογονιμότητας. Με την εφαρμογή αυτής της τεχνικής κατέστη δυνατή η απόκτηση βιολογικών απογόνων σε άνδρες που προηγουμένως θεωρούνταν στείροι. Η ICSI είναι η τεχνική της εγχύσεως ενός μόνο σπερματοζωαρίου μέσα στο ωάριο. Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1992 ως τροποποίηση της εξωσωματικής γονιμοποίησης in vitro (IVF) και ήταν ένα εξαιρετικό επίτευγμα στον τομέα των μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART). Η χρήση σπερματοζωαρίων που δεν προήλθαν από την εκσπερμάτιση σε συνδυασμό με την ICSI έχει γίνει μία παγκοσμίως καθιερωμένη διαδικασία ζευγαριών με αζωοσπερμικούς άνδρες που επιθυμούν να αποκτήσουν βιολογικούς απογόνους (14, 353, 354).

Οι τεχνικές ανάκτησης σπέρματος (SRT) είναι χειρουργικές μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για τη λήψη σπερματοζωαρίων από την επιδιδυμίδα και τους όρχεις των αζωοσπερμικών ανδρών που αναζητούν θεραπεία γονιμότητας (302). Μετά την ανάκτηση σπερματοζωαρίων χρησιμοποιείται η ICSI (355). Εναλλακτικά, τα σπερματοζωάρια που θα ανακτηθούν μπορεί να διατηρηθούν σε κρυοσυντήρηση για μελλοντική χρήση (356, 357). Η χρήση σπερματοζωαρίων που δεν προήλθαν από την εκσπερμάτιση σε συνδυασμό με την ICSI έχει γίνει μια καθιερωμένη διαδικασία για ζευγάρια των οποίων ο άντρας πάσχει από αζωοσπερμία και επιθυμούν να αποκτήσουν βιολογικούς απογόνους (358, 359).

Ενδείξεις θεραπευτικής βιοψίας όρχεως

Η θεραπευτική βιοψία όρχεως (TTB) για την ανάκτηση σπερματοζωαρίων για ICSI έχει ένδειξη στις ακόλουθες περιπτώσεις:

1. Αποφρακτική αζωοσπερμία
2. Μη αποφρακτική αζωοσπερμία
3. Νεκροσπερμία
4. Ανοργασμία
5. Παλίνδρομη εκσπερμάτιση
6. Για υψηλότερα ποσοστά εγκυμοσύνης σε άνδρες με:
  - Αυξημένο DFI σπέρματος
  - Ολιγοσπερμία
  - Κρυπτοαζωοσπερμία

Η TTB θα μπορούσε να είναι μια καλή εναλλακτική επιλογή ανδρών με αποφρακτική αζωοσπερμία οι οποίοι δεν επιθυμούν την χειρουργική αποκατάσταση της βατότητας της αναπαραγωγικής οδού του άνδρα. Επίσης ενδείκνυται όταν η αποκατάσταση της απόφραξης είναι αδύνατη ή απέτυχε και σε περιπτώσεις συγγενούς αμφοτερόπλευρης απλασίας του σπερματικού πόρου. Λύση δίνει και σε περιπτώσεις με πολλαπλά στενώματα της αποχετευτικής οδού του σπέρματος απότοκο φυματίωσης ή άλλου λοιμογόνου παράγοντα. Στην ΟΑ η ανάκτηση σπερματοζωαρίων μπορεί να πραγματοποιηθεί από οποιοδήποτε σημείο κατά μήκος της αναπαραγωγικής οδού, από τον σπερματικό πόρο ή από την επιδιδυμίδα ή και από τους όρχεις.

Ωστόσο, στη NOA η ανάκτηση σπερματοζωαρίων πρέπει να πραγματοποιηθεί από τον όρχι. Η σπερματογένεση εντός των όρχεων μπορεί να είναι εστιακή, πράγμα που σημαίνει ότι τα σπερματοζωάρια συνήθως εντοπίζονται σε μικρές και απομονωμένες εστίες. Έχουν αναφερθεί θετικά ποσοστά ανάκτησης σπερματοζωαρίων έως και 50% των ασθενών με NOA (360, 361). Σε περίπτωση πλήρους μικροελλείψεων AZFa και AZFb, η TTB αντενδείκνυται γιατί η πιθανότητα ανάκτησης σπερματοζωαρίων είναι μηδενική (250). Αντίθετα, οι ασθενείς με σύνδρομο Klinefelter (239) και ιστορικό κρυψορχίας έχει αποδειχθεί ότι έχουν αρκετές πιθανότητες να βρεθούν σπερματοζωάρια στη TTB (362).

Σε περιπτώσεις ολικής ασθενοσπερμίας ή νεκροσπερμίας τα σπερματοζωάρια μπορεί να είναι ακίνητα αλλά βιώσιμα, ή μη βιώσιμα και ακίνητα. Σε περίπτωση βιώσιμων, μη κινητών σπερματοζωαρίων, μπορούν να ταυτοποιηθούν με τον έλεγχο της υπο-οσμωτικής

διόγκωσης των σπερματοζωαρίων (363) και να χρησιμοποιηθούν για ICSI. Ωστόσο, σε περίπτωση νεκροσπερμίας (μη βιώσιμα, ακίνητα), είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται σπερματοζωάρια που ανακτώνται από τους όρχεις, καθώς αυτά είναι συνήθως βιώσιμα και μερικές φορές μπορεί να είναι και κινητά (364).

Σε περιπτώσεις ανοργασμίας και αδυναμία εκσπερμάτισης η ΤΤΒ μπορεί να είναι η θεραπευτική επιλογή όταν η δονητική διέγερση του πέους και η ηλεκτροεσπερμάτιση αποτύχουν ή δεν είναι διαθέσιμα (355, 365, 366).

Η υπογονιμότητα είναι το κύριο πρόβλημα των ασθενών με παλίνδρομη εκσπερμάτιση. Η ΤΤΒ είναι μια μορφή θεραπείας μαζί με την συλλογή ούρων και την απομόνωση σπερματοζωαρίων μετά την εκσπερμάτιση (367).

Η γονιμοποίηση των ωαρίων από σπερματοζωάρια με κατακερματισμένο DNA μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο της ανεπιτυχούς γονιμοποίησης, της διακοπής της ανάπτυξης του εμβρύου, της αποτυχίας εμφύτευσης, της αποβολής, των συγγενών δυσπλασιών, της περιγεννητικής και νεογνικής νοσηρότητας (368-370). Συχνά οι υπογόνιμοι άντρες έχουν αυξημένα ποσοστά κατακερματισμένου DNA στο εκσπερμάτισμα (371, 372).

Η κισσοκήλη, οι συστηματικές ασθένειες, οι λοιμώξεις των ανδρικών επικουρικών αδένων, η προχωρημένη πατρική ηλικία, η παχυσαρκία, ο τρόπος ζωής, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, η ακτινοβολία και η έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες είναι μερικές από τις καταστάσεις που σχετίζονται με τον κατακερματισμό του DNA (Sperm DNA fragmentation - SDF). Οι προαναφερθέντες παράγοντες έχουν κοινό χαρακτηριστικό το οξειδωτικό στρες, το οποίο αντιπροσωπεύει μια σημαντική αιτία του SDF (215). Ο μηχανισμός βλάβης περιλαμβάνει επίθεση αντιδραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) στις μεμβράνες των σπερματοζωαρίων, στο πυρηνικό και στο μιτοχονδριακό DNA, κυρίως κατά τη διέλευση των σπερματοζωαρίων μέσω της ανδρικής αναπαραγωγικής οδού (373, 374).

Είναι ενδιαφέρον ότι δεδομένα από μελέτες που αξιολογούν δείγματα από τους όρχεις και από την εκσπερμάτιση σε ολιγοσπερμικούς άνδρες δείχνουν ότι το SDF είναι δύο έως τρεις φορές χαμηλότερος στα ορχικά σπερματοζωάρια σε σχέση με τα σπερματοζωάρια της εκσπερμάτισης (375-377).

Πρόσφατες μελέτες που παρέχουν δεδομένα φυσιολογικών γεννήσεων επιβεβαιώνουν την αποτελεσματικότητα των ορχικών σπερματοζωαρίων για την ICSI σε άνδρες με υψηλό κατακερματισμό του DNA (378-380). Έτσι, παρά τα περιορισμένα

στοιχεία και την έλλειψη ελεγχόμενων δοκιμών, δεδομένα από επτά αναδρομικές μελέτες και τρεις μελέτες προοπτικής, συμπεριλαμβανομένων συνολικά 830 ασθενών και 902 κύκλων ICSI, υποδηλώνουν ότι οι κύκλοι ICSI που χρησιμοποίησαν ορχικά σπερματοζωάρια ήταν ανώτεροι από τα σπερματοζωάρια της εκσπερμάτισης. Τα ορχικά σπερματοζωάρια θεωρείται ότι δεν υπόκεινται στη βλάβη της χρωματίνης που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες κατά τη διέλευση των σπερματοζωαρίων από το γεννητικό σύστημα του άρρενος (381). Ως αποτέλεσμα, οι πιθανότητες γονιμοποίησης ωαρίων από σπερματοζωάρια γενετικά ανέπαφα και ο σχηματισμός φυσιολογικού εμβρυϊκού γονιδιώματος αυξάνεται.

Οι Weissman κ.ά. το 2008 ανέφεραν την πρώτη φορά κύκλους ICSI με τη χρήση σπερματοζωαρίων από τον όρχι ασθενών με σοβαρή олиγοζωοσπερμία (<5 εκατομμύρια σπέρμα/mL) (382). Οι συγγραφείς πραγματοποίησαν ενέσεις ορχικών σπερματοζωαρίων σε τέσσερα ζευγάρια με ιστορικό πολλαπλών αποτυχημένων κύκλων IVF/ICSI με χρήση σπερματοζωαρίων κακής ποιότητας. Την ημέρα της ανάκτησης των ωαρίων, πραγματοποιήθηκε ανάκτηση σπέρματος σε όλες τις περιπτώσεις.

Δεδομένης της επιτυχίας που ανέφεραν οι Weissman κ.ά. (382), πολλοί συγγραφείς προσπάθησαν να διερευνήσουν τη χρησιμότητα της ανάκτησης σπέρματος για ICSI σε μη αζωοσπερμικούς ασθενείς με σοβαρή ολιγοσπερμία ή κρυπτοζωοσπερμία (383-386). Αυτές οι μελέτες αναφέρουν συνολικά περισσότερες εγκυμοσύνες με τη χρήση σπερματοζωαρίων από τον όρχι σε σχέση με τα σπερματοζωάρια από την εκσπερμάτιση.

Πρόσφατα, δημοσιεύθηκαν εκθέσεις και συστηματικές ανασκοπήσεις σχετικά με το συγκεκριμένο θέμα (387-391). Σε μια συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση του 2018, οι Kang κ.ά (389) συγκέντρωσαν τα δεδομένα έξι μελετών, συμπεριλαμβανομένων συνολικά 578 ασθενών και 761 κύκλων ICSI. Οι συγγραφείς έδειξαν ότι η ανάκτηση σπερματοζωαρίων και οι κύκλοι ICSI με ορχικά σπερματοζωάρια βελτίωσαν την πιθανότητα επίτευξης εμβρύων καλής ποιότητας, την εμφύτευση και την εγκυμοσύνη.

Συνολικά, στοιχεία από επτά αναδρομικές μελέτες και μία μελέτη προοπτικής, συμπεριλαμβανομένων συνολικά 613 ασθενών και 799 κύκλων ICSI, υποδηλώνουν ότι οι κύκλοι ICSI με ορχικά σπερματοζωάρια ήταν ανώτεροι από τους αντίστοιχους με σπερματοζωάρια εκσπερμάτισης. Ωστόσο, δεν έχει δημοσιευτεί ακόμη τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη δοκιμή που να υποστηρίζει τη χρήση ρουτίνας για την ανάκτηση ορχικών σπερματοζωαρίων για την ICSI σε μη αζωοσπερμικούς άνδρες με χαμηλό αριθμό σπερματοζωαρίων.

## Χειρουργικές τεχνικές λήψης σπερματοζωαρίων

Η μέθοδος επιλογής για την λήψη σπερματοζωαρίων βασίζεται στον τύπο της αζωοσπερμίας, η οποία μπορεί να είναι αποφρακτική ή μη αποφρακτική αλλά και τις προτιμήσεις και την εμπειρία του χειρουργού (224, 254). Σε άνδρες με αποφρακτική αζωοσπερμία, το σπέρμα μπορεί να ληφθεί από την επιδιδυμίδα ή / και τους όρχεις, ενώ στους άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία είναι χρήσιμες μόνο οι διαδικασίες λήψης σπέρματος από τους όρχεις (302, 360).

Οι βασικοί στόχοι που θα πρέπει να επιτευχθούν κατά τη διάρκεια της λήψης σπέρματος είναι : (1) απόκτηση επαρκούς αριθμού σπερματοζωαρίων (για άμεση χρήση και κρυοσυντήρηση), (2) ανάκτηση όσο το δυνατόν ποιοτικότερων σπερματοζωαρίων και (3) ελαχιστοποίηση της βλάβης στην αναπαραγωγική οδό (392).

Οι γενικές μέθοδοι λήψης σπερματοζωαρίων είναι δύο:

- Ανοικτή χειρουργική λήψη σπερματοζωαρίων
- Διαδερμική λήψη σπερματοζωαρίων

Η ανοικτή χειρουργική επέμβαση μπορεί να πραγματοποιηθεί για την ανάκτηση σπερματοζωαρίων από την επιδιδυμίδα ή τον όρχι με ή χωρίς χειρουργικό μικροσκόπιο. Οι διαδερμικές μέθοδοι, από την άλλη πλευρά, απαιτούν χρήση βελόνας (365).

**Πίνακας 4:** Οι διάφορες τεχνικές λήψης σπερματοζωαρίων (393).

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΛΗΨΗΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ	ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗ ΛΗΨΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ	ΑΝΟΙΚΤΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΛΗΨΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ
Επιδιδυμίδα	PESA	MESA, OEFNA
Όρχι	TESA, NAB, TCNB, UGPRT	TESE, m-TESE, SST

PESA: Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration

MESA: Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration

OEFNA: Open Epididymal Fine Needle Aspiration

TESA: Testicular Sperm Aspiration

NAB: Needle Aspiration Biopsy

UGPRT: Ultrasonographically guided puncture of the human rete testis

TCNB: Testicular Core Needle Biopsy

TESE: Testicular Sperm Extraction

m-TESE: Microsurgical TEsticular Sperm Extraction

SSTB: Single Seminiferous Tubule Biopsy

Στην αποφρακτική αζωοσπερμία, όταν η απόφραξη δε διορθώνεται, το σπέρμα μπορεί να ληφθεί από: α) τους όρχεις (TESE, m-TESE, SSTB, TESA, TCNB, NAB) β) την επιδιδυμίδα (PESA, MESA, OEFNA) και γ) τον σπερματικό πόρο (VDSA). Ενώ στην μη αποφρακτική αζωοσπερμία, το σπέρμα πρέπει να λαμβάνεται απευθείας από τους όρχεις (TESE, m-TESE, SSTB).

Λήψη σπέρματοζωαρίων απο την επιδιδυμίδα

Ανοικτή χειρουργική λήψη σπέρματοζωαρίων απο την επιδιδυμίδα

**MESA:**Μικροχειρουργική αναρρόφηση σπέρματοζωαρίων από την επιδιδυμίδα

Η MESA περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Temple-Smith κ.ά. το 1985 (394). Στην MESA παρασκευάζεται η επιδιδυμίδα μέσω μιας τομής 2-3 εκ. στο όσχεο. Με χρήση μικροσκοπίου και ψαλίδι μικροχειρουργικής γίνεται διάνοιξη της διογκωμένης επιδιδυμίδας και αναρρόφηση του επιδιδυμικού υγρού για ανίχνευση σπέρματοζωαρίων (394, 395)

Ένα από τα πλεονεκτήματα της MESA είναι οι ελάχιστες επιπλοκές. Τα σπέρματοζωάρια που βρίσκονται στην επιδιδυμίδα έχουν καλύτερη κινητικότητα από αυτά του όρχι. Μεγάλος αριθμός σπέρματοζωαρίων μπορεί να ανακτηθεί και να πραγματοποιηθεί κρυοσυντήρηση σπέρματος με μία μόνο επέμβαση. Στα μειονεκτήματα της MESA συμπεριλαμβάνεται η απαραίτητη γενική αναισθησία, η χρήση του μικροσκοπίου και οι μικροχειρουργικές δεξιότητες του χειρουργού. Επίσης η τεχνική αυτή δεν έχει ένδειξη στη μη αποφρακτική αζωοσπερμία (355, 395-397).

**OEFNA:** Ανοικτή αναρρόφηση δια λεπτής βελόνης από την επιδιδυμίδα

Στην OEFNA παρασκευάζεται η επιδιδυμίδα μέσω οσχεϊκής τομής και χωρίς να γίνει τομή σε αυτήν πραγματοποιείται αναρρόφηση επιδιδυμικού υγρού μέσω μιας σύριγγας με βελόνα 26-G. Επίσης αναρροφάται το επιδιδυμικό υγρό που θα ρέει από την επιδιδυμίδα όταν γίνει η αφαίρεση της βελόνας (365, 393).

Στα πλεονεκτήματα της OEFNA όπως και στη MESA, επιδιδυμικό υγρό μπορεί να αναρροφηθεί υπό όραση από διαφορετικές θέσεις, επιτυγχάνοντας έτσι τον μέγιστο αριθμό σπερματοζωαρίων. Δεν απαιτεί γενική αναισθησία, ειδικό εξοπλισμό ή μικροχειρουργικές δεξιότητες. Στα μειονεκτήματα της OEFNA είναι ότι πρόκειται για μια ανοικτή χειρουργική επέμβαση. Επίσης η τεχνική αυτή δεν έχει ένδειξη στη μη αποφρακτική αζωοσπερμία (365, 393).

Διαδερμική λήψη σπερματοζωαρίων απο την επιδιδυμίδα

**PESA:** Διαδερμική αναρρόφηση σπερματοζωαρίων από την επιδιδυμίδα

Στην PESA μέσω μίας βελόνας 19-21G πραγματοποιείται παρακέντηση της επιδιδυμίδας και γίνεται αναρρόφηση του επιδιδυμικού υγρού. Αυτή η τεχνική είναι απλή και γρήγορη, δεν απαιτεί γενική αναισθησία, εξειδικευμένο εξοπλισμό και μικροχειρουργικές δεξιότητες. Ο ασθενής αποφεύγει την ανοικτή χειρουργική επέμβαση και η διαδικασία αυτή μπορεί να επαναληφθεί. Είναι μια τυφλή μέθοδος και αυτό αποτελεί το κύριο μειονέκτημα αυτής της τεχνικής καθώς η επιδιδυμίδα δεν είναι ορατή και η θέση αναρρόφησης δεν ελέγχεται με ακρίβεια. Χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερο αριθμό επιπλοκών όπως άλγος, αιμάτωμα, η τραυματισμό αγγείου επιδιδυμίδας ή όρχεως. Μικρότερη ποσότητα αναρρόφησης σπερματοζωαρίων σε σχέση με MESA, OEFNA. Δεν έχει ένδειξη στη μη αποφρακτική αζωοσπερμία.(393, 398-400).

Λήψη σπερματοζωαρίων απο τον όρχι

Διαδερμική λήψη σπερματοζωαρίων απο τον όρχι

**TESA:** Διαδερμική αναρρόφηση ορχικών σπερματοζωαρίων

Στην TESA μέσω μίας λεπτής βελόνης 22-G πραγματοποιείται παρακέντηση στον όρχι και αναρρόφηση σπερματικού υγρού. Το αναρροφώμενο υγρό ελέγχεται για σπερματοζωάρια. Η τεχνική αυτή είναι χρήσιμη κυρίως σε άνδρες με αποφρακτική αζωοσπερμία (401). Πρόκειται για μια απλή, μη χειρουργική διαδικασία που μπορεί να γίνει χωρίς ειδική εκπαίδευση ή εξοπλισμό. Στα μειονεκτήματα συγκαταλέγεται ο κίνδυνος διάτρησης ενός αγγείου και δημιουργία αιματώματος ή αιματοκήλης, δεδομένου ότι πρόκειται για τυφλή διαδικασία. Η ποσότητα σπερματοζωαρίων που μπορεί να ληφθεί είναι μικρή. Η TESA

συχνά αποτυγχάνει στη λήψη σπερματοζωαρίων σε άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία που όταν πραγματοποιήθηκε η βιοψία των όρχεων βρέθηκαν σπερματοζωάρια (393, 401, 402).

**NAB:** Βιοψία αναρρόφησης με βελόνα

Στην NAB εισάγεται φλεβοκαθετήρας πεταλούδα 18-G στον όρχι με τοπική ή γενική αναισθησία. Μόλις η βελόνα εισέλθει στον όρχι πραγματοποιείται αναρρόφηση χρησιμοποιώντας σύριγγα των 10 ml. Η βελόνα μπορεί να περιστραφεί κατά 180 μοίρες (για να κόψει τον ιστό) και η έξοδος και η κίνηση της βελόνας επαναλαμβάνεται μερικές φορές. Η τεχνική αυτή είναι απλή και γρήγορη ωστόσο δεδομένου ότι πρόκειται για τυφλή διαδικασία με μεγάλη βελόνα, φέρει τον κίνδυνο να δημιουργήσει αιματώματα, να προκαλέσει αιμορραγία εντός των όρχεων ή να προκαλέσει βλάβη στην επιδιδυμίδα (393, 403).

**UGPRT** – Υπερηχογραφικά κατευθυνόμενη παρακέντηση από το ορχικό δίκτυο

Με τη βοήθεια του υπερήχου εντοπίζεται το ορχικό δίκτυο του Haller. Στην συνέχεια εισάγεται μία λεπτή βελόνα και κατευθύνεται μέσω του υπερήχου στο ορχικό δίκτυο. Ακολουθεί αναρρόφηση του υγρού. Η τεχνική αυτή είναι γρήγορη, ελάχιστα επεμβατική και με μικρό κόστος. Υπάρχει μικρή πιθανότητα τραυματισμού των αιμοφόρων αγγείων του όρχεως. Επίσης δεν μειώνεται το ορχικό παρέγχυμα. Απαιτούνται ελάχιστα εργαλεία και αναλώσιμα. Δεν απαιτούνται μικροχειρουργικές δεξιότητες. Από την άλλη πλευρά γίνεται λήψη μικρού αριθμού σπερματοζωαρίων σε άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία. Συνήθως δεν αρκεί το δείγμα για κρυοσυντήρηση. Επί αρνητικών ευρημάτων για σπερματοζωάρια συνιστάτε βιοψία όρχεως (404).

**TCNB:** Διαδερμική βιοψία όρχεως.

Βιοψία όρχεως μπορεί να γίνει διαδερμικά και να ληφθεί ιστός χρησιμοποιώντας βελόνα βιοψίας 14G ή το πιστόλι βιοψίας που χρησιμοποιούμε στην βιοψία του προστάτη (π.χ. βελόνα Tru-cut™ ή πιστόλι Biopty™). Είναι ιδιαίτερα χρήσιμο σε άνδρες με ίνωση όρχεων στους οποίους η NAB μπορεί να αποτύχει να ανακτήσει επαρκή ιστό. Σε αντίθεση με την τεχνική NAB στην οποία ένα σωληνάριο ξεδιπλώνεται έξω από τον όρχι, η βελόνα βιοψίας κόβει μεγαλύτερο αριθμό σπερματικών σωληναρίων προκαλώντας έτσι



μεγαλύτερο τραύμα. Η ποσότητα του ιστού που ανακτάται μπορεί να είναι πολύ μικρότερη σε σύγκριση με τη NAB. Επίσης, αυτές οι ειδικές βελόνες αντιπροσωπεύουν ένα επιπλέον κόστος (393).

Χειρουργική λήψη σπερματοζωαρίων απο τον όρχι

**TESE:** Ανοικτή βιοψία όρχεως

Η βιοψία όρχεως για ανάκτηση σπερματοζωαρίων σε συνδυασμό με κύκλους ICSI περιγράφηκε για πρώτη από τους Devroey κ.ά το 1995 (405). Η TESE είναι μια τυπική ανοικτή χειρουργική επέμβαση στην οποία πραγματοποιείται βιοψία για την λήψη ορχικού ιστού χωρίς τη βοήθεια της μεγέθυνσης του μικροσκοπίου. Μία εγκάρσια τομή 2 cm πραγματοποιείται στην πρόσθια επιφάνεια του δέρματος του οσχέου, του δαρτού και του ελυτροειδούς χιτώνα του όρχεως. Στη συνέχεια πραγματοποιείται μια τομή 1 cm στον ινώδη χιτώνα και εφαρμόζεται ήπια πίεση στους όρχεις ώστε να γίνει εξώθηση του ορχικού παρεγχύματος. Μέσω αυτής της τεχνικής λαμβάνουμε ένα ή πολλαπλά ιστοτεμάχια μεγέθους περίπου 5x5 χιλ. Τα δείγματα ορχικού ιστού αποστέλλονται στο εργαστήριο για επεξεργασία και άμεση μικροσκοπική εξέταση. Στη συνέχεια γίνεται συρραφή κατά στρώματα του ινώδους χιτώνα και των περιβλημάτων του όρχεως. Η τεχνική αυτή θεωρείται σχετικά εύκολη μέθοδος που μπορεί να εκτελεστεί από οποιονδήποτε χειρουργό και αποφέρει μια ικανοποιητική ποσότητα ιστού. Ωστόσο πρόκειται για μια ανοικτή χειρουργική επέμβαση. Κατά την τομή και τη συρραφή του ινώδους χιτώνα του όρχεως και κατά την αποκοπή των σπερματικών σωληναρίων, τα αγγεία του όρχεως μπορούν να υποστούν βλάβη.

**SSTB:** Βιοψία ενός σπερματικού σωληναρίου

Η SSTB θεωρείται μία παραλλαγή της TESE στην οποία γίνεται μία οσχεϊκή τομή και παρασκευάζεται ο όρχις. Σε μία ανάγγειο περιοχή του όρχι εισάγεται μία βελόνα 26-G. Με ψαλίδι μικροχειρουργικής γίνεται διεύρυνση του ανοίγματος και επιλέγεται ένα μόνο σπερματικό σωληνάριο. Μπορεί να επαναληφθεί η διαδικασία σε διάφορα σημεία. Μπορεί να πραγματοποιηθεί και με τη χρήση μικροσκοπίου εάν αυτό είναι διαθέσιμο. Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δεν χρειάζεται εξειδίκευση και μπορεί να επαναληφθεί. Από την άλλη πλευρά πρόκειται για μια ανοικτή χειρουργική επέμβαση. Η ποσότητα σπερματοζωαρίων που θα ληφθούν είναι μικρή. Υπάρχει κίνδυνος ορχικής ατροφίας και μετεγχειρητικό άλγος.

### **m-TESE** - Μικροχειρουργική βιοψία όρχεως

Η μικροχειρουργική βιοψία όρχεως περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Schlegel το 1999 (305). Η χειρουργική τεχνική περιλαμβάνει την παρασκευή των όρχεων μέσω μίας εγκάρσιας τομής του όσχεου περίπου 2-3 cm. Στη συνέχεια η τομή επεκτείνεται στον δαρτό και τον ελυτροειδή χιτώνα του όρχεως. Με τη βοήθεια του μικροσκοπίου και με μεγέθυνση 6-8 φορές γίνεται μία τομή στη μεσότητα του όρχι σε μια ανάγγειο περιοχή του ινώδη χιτώνα με επακόλουθη έκθεση του ορχικού παρεγχύματος. Με τη βοήθεια του μικροσκοπίου εντοπίζονται οι περιοχές ορχικού παρεγχύματος με μικρής διαμέτρου σπερματικά σωληνάρια τα οποία έχουν λιγότερες πιθανότητες ανεύρεσης σπερματοζωαρίων και περιοχές με πιο διατεταμένα μεγαλύτερης διαμέτρου σπερματικά σωληνάρια. Η εκτομή του ορχικού παρεγχύματος πραγματοποιείται υπο μεγέθυνση 16-25x αναζητώντας διατεταμένα με μεγαλύτερη διάμετρο σπερματικά σωληνάρια (πιο πιθανό να περιέχουν βλαστικά κύτταρα και τελικά φυσιολογική παραγωγή σπερματοζωαρίων). Με τη βοήθεια μικροχειρουργικών εργαλείων επιλέγονται τα σπερματικά σωληνάρια και αποσπώνται με προσοχή (305, 406).

Στην micro-TESE αφαιρούνται προσεκτικά τα διατεταμένα σπερματικά σωληνάρια χρησιμοποιώντας μικροχειρουργική λαβίδα. Εάν δεν φαίνονται διατεταμένα τα σπερματικά σωληνάρια, τότε πραγματοποιείται εκτομή οποιοδήποτε σπερματικού σωληναρίου διαφορετικού μεγέθους σε σχέση με τα υπόλοιπα. Εάν όλα τα σωληνάρια έχουν παρόμοια εμφάνιση, εκτελούνται τυχαίες βιοψίες σε κάθε πόλο των όρχεων. Στη συνέχεια ο ινώδης χιτώνας και τα περιβλήματα του όρχεως συγκλείνονται κατά στρώματα.

Η τεχνική αυτή έχει καλύτερα ποσοστά επιτυχούς ανάκτησης από την TESE ή TESA, διότι τα σπερματικά σωληνάρια που περιέχουν προχωρημένες εστίες σπερματογένεσης μπορούν να αναγνωριστούν καλύτερα (407). Η ποσότητα σπερματοζωαρίων που θα ανακτηθούν είναι μεγαλύτερη γιατί λαμβάνονται τα σπερματικά σωληνάρια με μεγαλύτερη διάμετρο(314). Έχει χαμηλό ρίσκο επιπλοκών γιατί αφαιρούμε λιγότερο ιστό και τα αγγεία διακρίνονται σε μεγαλύτερο βαθμό με την βοήθεια του μικροσκοπίου (408). Ωστόσο σημαντικό μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι το αυξημένο κόστος και θεωρείται χρονοβόρα διαδικασία. Απαιτεί γενική αναισθησία, χρήση μικροσκοπίου, ειδική εκπαίδευση για την απόκτηση μικροχειρουργικών δεξιοτήτων και απαιτείται κύκλος εκμάθησης της τεχνικής. Το μετεγχειρητικό άλγος είναι σημαντικό (408).

### Επιλογή τεχνικής λήψης σπερματοζωαρίων

Σύμφωνα με μία μετανάλυση στην Cochrane τα δεδομένα για να συστηθεί κάποια συγκεκριμένη τεχνική λήψης σπέρματος ήταν ανεπαρκή (409). Σε ασθενείς με αποφρακτική αζωοσπερμία, όταν η απόφραξη δε διορθώνεται, η λήψη σπέρματος θα πρέπει να επιχειρηθεί από την επιδιδυμίδα. Επί μη ανεύρεσης στην επιδιδυμίδα και σε ασθενείς με μη αποφρακτική αζωοσπερμία το σπέρμα θα πρέπει να λαμβάνεται από τον όρχι.

Δεδομένου ότι η OEFNA προσφέρει τα πλεονεκτήματα της MESA χωρίς τα μειονεκτήματα της, είναι η προτιμώμενη τεχνική όταν απαιτείται ανοικτή επέμβαση στην επιδιδυμίδα. Τόσο η TESA όσο και η NAB μπορούν να ανακτήσουν αρκετά σπερματοζωάρια σε περιπτώσεις αποφρακτικής αζωοσπερμίας. Ωστόσο, η διαδικασία NAB αποδίδει πολύ περισσότερο σπέρμα από το TESA. Ως εκ τούτου, το NAB προτιμάται έναντι του TESA, ειδικά σε περιπτώσεις που η σπερματογένεση είναι μειωμένη. Η τεχνική της διαδερμικής NAB δίνει επαρκείς ιστούς στις περισσότερες περιπτώσεις και είναι ψυχολογικά πιο αποδεκτή από τους ασθενείς. Οι ανοικτές μέθοδοι (TESE, m-TESE και SSTB) επιτρέπουν εκτεταμένη δειγματοληψία και δίνουν τις καλύτερες πιθανότητες ανάκτησης σπέρματος, ειδικά όταν ο όρχις είναι μικρός και ινωτικός.

Οι διαδερμικές τεχνικές λήψης σπέρματος από τον όρχι σε σχέση με τις ανοικτές τεχνικές έχουν χαμηλότερα ποσοστά επιτυχούς λήψης ορχικών σπερματοζωαρίων. Επιπλέον δε μας παρέχουν δείγμα για ιστολογική εξέταση προς αποκλεισμό σπερματογενετικής ανεπάρκειας και για ανεύρεση ορχικών παθολογιών όπως η ενδοσωληναριακή νεοπλασία από γεννητικά κύτταρα και όγκοι όρχεως. Επιπλέον με τις διαδερμικές τεχνικές υπάρχουν περισσότερες πιθανότητες για βλάβη των αγγείων ή των σπερματικών σωληναρίων του όρχεως σε σχέση με τις ανοικτές τεχνικές.

Ένας θετικός προγνωστικός παράγοντας για την ανεύρεση σπερματοζωαρίων στη βιοψία του όρχεως είναι η καλή ιστολογία του δείγματος της διαγνωστικής βιοψίας καθώς υπάρχει θετική συσχέτιση με την πιθανότητα εύρεσης σπερματοζωαρίων κατά τη διαδικασία λήψης σπερματοζωαρίων από τον όρχι και την ICSI. Αντίθετα, δεν έχει διαπιστωθεί κάποια σχέση ανάμεσα στην επιτυχή λήψη σπερματοζωαρίων και στα επίπεδα FSH, ινχμπίνης Β ή του όγκου του όρχεως (410). Η πιθανότητα ανεύρεσης σπερματοζωαρίων είναι πρακτικά μηδέν σε περιπτώσεις ολικών μικροελλείψεων στις χρωμοσωμικές περιοχές AZFa και AZFb (246).

Η τεχνική TESE αποτελεί την τεχνική επιλογής για τη λήψη σπερματοζωαρίων από τον όρχι ασθενών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία καθώς έχει εξαιρετική επαναληψιμότητα. Χρησιμοποιώντας την τεχνική m-TESE, το ποσοστό επιτυχούς ανάκτησης σπερματοζωαρίων ήταν περίπου στο 50% των εξεταζόμενων ανδρών. Σε αυτούς τους άνδρες στους οποίους βρέθηκαν σπερματοζωάρια, έχει επιτευχθεί κύηση στο 50% χρησιμοποιώντας ICSI στο Cornell. Το ποσοστό αυτόματων αποβολών είναι 19%. Το αρκετά υψηλό ποσοστό αυτόματων αποβολών πιθανόν οφείλεται στην αυξημένη συχνότητα χρωμοσωμικών ανωμαλιών και στο κατακερματισμό του DNA στο σπέρμα των ανδρών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία. Ακόμη και σε σοβαρές περιπτώσεις συγγενούς ή επίκτητης ανεπάρκειας των όρχεων, όπως στο σύνδρομο Sertoli-cell-only στην αζωοσπερμία μετά την χημειοθεραπεία και στο μη-μωσαϊκό σύνδρομο Klinefelter (47XXY) έχουν ανακτηθεί σπερματοζωάρια με επακόλουθες εγκυμοσύνες και γέννηση υγιών παιδιών. Επίσης η τεχνική m-TESE σέβεται περισσότερο την αγγείωση του όρχεως, απαιτεί λήψη σημαντικά μικρότερης ποσότητας ορχικού ιστού άρα μειώνει κατά πολύ την πιθανότητα εμφάνισης υπογοναδισμού.

Σε μία πρόσφατη μετανάλυση δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά το ποσοστό επιτυχούς ανάκτησης σπερματοζωαρίων μεταξύ TESE και m-TESE. Για να αποσαφηνιστεί οριστικά εάν μια τεχνική είναι ανώτερη από την άλλη, υπάρχει ανάγκη για μια καλά σχεδιασμένη τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη δοκιμή για τη σύγκριση της m-TESE με τη TESE σε άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία.

#### Επιπλοκές βιοψίας όρχεως

Οι κύριες επιπλοκές των διαδικασιών ανάκτησης σπερματοζωαρίων είναι το αιμάτωμα, η επιμόλυνση του χειρουργικού τραύματος, η ίνωση του ορχικού παρεγχύματος και η ατροφία των όρχεων (411). Αυτά μπορεί να συμβούν μετά από διαδερμικές και ανοιχτές τεχνικές TTΒ. Τα ποσοστά επιπλοκών ποικίλλουν ανάλογα με την τεχνική ανάκτησης σπέρματος. Οι διαδερμικές ανακτήσεις έχουν αυξημένο κίνδυνο αιματώματος σε σύγκριση με ανοιχτές τεχνικές (358, 412). Ωστόσο, από διαδερμικές τεχνικές εκτός από τον μικρό πόνο και το τοπικό οίδημα, δεν έχουν αναφερθεί κλινικά σημαντικές μετεγχειρητικές επιπλοκές που να απαιτούν ιατρική ή νοσοκομειακή περίθαλψη (302, 413).

Μετά την TESE τα επίπεδα τεστοστερόνης μπορεί να μειωθούν κατά 20% ή περισσότερο και χρειάζονται πάνω από 12 μήνες για να ανακάμψουν (414). Άνδρες με μικρούς όρχεις, οι οποίοι υποβάλλονται σε πολλαπλές βιοψίες, κινδυνεύουν περισσότερο και πρέπει να παρακολουθούνται για πιθανή εμφάνιση υπογοναδισμού (415). Από την άλλη πλευρά, η συχνότητα επιλοκών είναι χαμηλότερη με τη micro-TESE σε σύγκριση με την TESE (305, 360, 414, 416).

Στη micro-TESE τα αιμοφόρα αγγεία των όρχεων που βρίσκονται κάτω από τον ινώδη χιτώνα αναγνωρίζονται πριν από την διενέργεια της τομής. Επιπλέον, η μεγέθυνση και τα μικροχειρουργικά εργαλεία επιτρέπουν ως είναι δυνατόν ανέπαφη την αγγειακή παροχή αίματος του όρχεως (414). Ωστόσο, έχει τεκμηριωθεί σημαντική μείωση της τεστοστερόνης στον ορό μετά τη micro-TESE σε άνδρες που ήδη έχουν μειωμένη παραγωγή ανδρογόνων, όπως οι ασθενείς με σύνδρομο Klinefelter (417). Ωστόσο, τα επίπεδα τεστοστερόνης επιστρέφουν στις τιμές πριν την επέμβαση στα περισσότερα άτομα εντός 12 μηνών μετά τη χειρουργική επέμβαση (418). Στην πραγματικότητα, οι Ramasamy κ.ά. ανέφεραν επιστροφή στο 95% των επιπέδων τεστοστερόνης πριν από micro-TESE μετά από 18 μήνες (414). Δεδομένων των πιθανών σοβαρών μετεγχειρητικών επιλοκών της ανάκτησης σπερματοζωαρίων συνιστάται οι διαδικασίες αυτές να εκτελούνται από χειρουργούς που έχουν ειδική εκπαίδευση στις προαναφερθείσες τεχνικές (418).

#### Επεξεργασία ορχικού ιστού

Τα σπερματικά σωληνάρια που έχουν ληφθεί στην TTB χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής κατά την επεξεργασία για την ανεύρεση σπερματοζωαρίων. Προς αυτή την κατεύθυνση ο ρόλος του εργαστηρίου είναι σημαντικός, όχι μόνο στην διευκόλυνση της αναζήτησης σπερματοζωαρίων και στην επιλογή των σπερματοζωαρίων καλύτερης ποιότητας για κύκλους ICSI, αλλά και στη διατήρηση της βέλτιστης γονιμοποιητικής ικανότητας των σπερματοζωαρίων (419). Προκειμένου να επιτευχθούν αυτοί οι στόχοι, το εργαστήριο θα πρέπει: 1) να λαμβάνει την καλύτερη δυνατή ποιότητα ορχικού ιστού με ελάχιστες ή καθόλου ουσίες που το επηρεάζουν όπως ερυθρά αιμοσφαίρια και επιβλαβείς μικροοργανισμούς, 2) να υπάρχει ελάχιστη κυτταρική βλάβη κατά την επεξεργασία του ιστού για αυτό το προσωπικό θα πρέπει να είναι κατάλληλα εκπαιδευμένο 3) να βελτιώσει την κινητικότητα και την γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων εάν είναι δυνατόν, με τη χρήση διεγερτικών ουσιών όπως η πεντοξυφιλίνη (420) ή επιλέγοντας

βιώσιμα σπερματοζώαρια για ICSI όταν υπάρχουν μόνο ακινητοποιημένα σπερματοζώαρια μέσω του ελέγχου της υπο-ωσμωτικής διόγκωσης των σπερματοζωαρίων (Hypo-Osmotic Swelling test, HOST) (421). Τα δείγματα ορχικού ιστού υποβάλλονται σε μηχανική διάσπαση ή/και ενζυμική πέψη (422-424).

Ο στόχος της επεξεργασίας ιστών είναι να διευκολυνθεί η αναζήτηση των σπερματοζωαρίων. Μετά την επεξεργασία, τα σπερματοζώαρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε για ICSI είτε για κρυοσυντήρηση (425-427).

## ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της έρευνας ήταν να προσδιοριστούν οι διαφορές μεταξύ της διαγνωστικής βιοψίας όρχεως (DTB) και της θεραπευτικής βιοψίας όρχεως (TTB). Στην παρούσα προοπτική μελέτη ανδρών με υπογονιμότητα έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων της DTB με την TTB όσον αφορά το περισσότερο ώριμο στάδιο ανδρικού γαμέτη που ανευρίσκεται στον ορχικό ιστό. Η μελέτη αυτή επεδίωξε να προσδιορίσει την διαγνωστική ακρίβεια της DTB στην πρόβλεψη της επιτυχούς ανάκτησης σπερματοζωαρίων σε 50 άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία (NOA) που υποβλήθηκαν σε micro-TESE στην Ουρολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Επίσης εκτιμήθηκε η διαγνωστική ακρίβεια των προεγχειρητικών επιπέδων πλάσματος της FSH, της LH, της ολικής τεστοστερόνης (TT), της προλακτίνης (PRL) της οιστραδιόλης (E2) και την ηλικίας των ασθενών με NOA για την πρόβλεψη της επιτυχούς ανάκτησης σπερματοζωαρίων στην TTB.





## **B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στη μελέτη αυτή συμπεριλήφθηκαν 50 άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία (NOA) που νοσηλεύτηκαν στην Ουρολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και υπεβλήθησαν σε μικροχειρουργική βιοψία όρχεως (micro-TESE) το χρονικό διάστημα μεταξύ Ιανουαρίου του 2017 και Δεκεμβρίου του 2019. Η κλινική αξιολόγηση των υπογόνιμων ανδρών στη μονάδα μας έγινε όπως περιγράφεται από τις Κατευθυντήριες Οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ουρολογικής Εταιρίας (Sexual and Reproductive Health, EAU Guidelines).

Σε όλους τους υπογόνιμους άνδρες καταγράφηκε λεπτομερές ιατρικό ιστορικό με σκοπό την ανεύρεση πιθανών παραγόντων κινδύνου που επηρεάζουν τη γονιμότητα όπως ο τρόπος ζωής, το κάπνισμα, οι συστηματικές παθήσεις, οι προηγηθείσες χειρουργικές επεμβάσεις στο ουρογεννητικό σύστημα, προηγούμενες λοιμώξεις του ουροποιογεννητικού και η χρήση πιθανών γοναδοτοξικών ουσιών. Από το σεξουαλικό ιστορικό συνελέγησαν πληροφορίες για προηγηθείσες εγκυμοσύνες ταξινομώντας με αυτό τον τρόπο την υπογονιμότητα σε πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή. Επίσης λήφθηκαν πληροφορίες για πιθανή σεξουαλική διαταραχή που να αφορά τη στύση, την εκσπερμάτιση, τον οργασμό και τη λίμπιντο. Όλοι οι ασθενείς στη συνέχεια ενημερώθηκαν για την χειρουργική επέμβαση και για το ερευνητικό μας έργο.

Στη συνέχεια ακολούθησε η φυσική εξέταση του ουροποιογεννητικού συστήματος αλλά και η γενική εξέταση των υπόλοιπων συστημάτων του ασθενούς. Δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στην εξέταση των όρχεων όπου ελέγχθηκαν για πιθανή ψηλαφητή σκληρία, για το μέγεθος αυτών, τη θέση και τον άξονα του όρχεως εντός του οσχέου, τη θέση της επιδιδυμίδας και την ψηλάφηση αυτής για την παρουσία ευαισθησίας καθώς και στον έλεγχο για πιθανή συνυπάρχουσα κισσοκίλη. Το όσχεο ελέγχθηκε για πιθανές δερματικές αλλοιώσεις ή ψηλαφητές διογκώσεις. Επίσης έγινε έλεγχος της φυσιολογικής πτύχωσης του. Εξετάστηκε το πέος για αποκλεισμό παρουσίας φίμωσης, υποσπαδία, επισπαδία, στένωσης του έξω στομίου της ουρήθρας ή εκκρίματος από την ουρήθρα. Για δερματικές αλλοιώσεις ή ψηλαφητές σκληρίες ελέγχθηκε η βάλανος και το σώμα του πέους. Η εξέταση του γεννητικού συστήματος ολοκληρώθηκε με την δακτυλική εξέταση του προστάτη όπου αναζητήθηκαν επώδυνα σημεία ή ψηλαφητές σκληρίες.

Η αζωοσπερμία επιβεβαιώθηκε σε όλους τους άνδρες με δύο διαφορετικά σπερμοδιαγράμματα. Στη συνέχεια κάθε δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 3000 στροφές για 15 λεπτά και ακολούθησε μια λεπτομερής μικροσκοπική εξέταση του ιζήματος με μικροσκόπιο αντίθετης φάσης σε μεγέθυνση 200 φορές σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ). Όλοι οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε G-banding Καρυότυπο και ελέγχθηκαν για μικροελλείψεις χρωμοσώματος Y. Κανένας από τους άνδρες δεν έλαβε εξωγενή χορήγηση τεστοστερόνης ή οποιαδήποτε άλλης φαρμακευτικής ουσίας με σκοπό τη βελτίωση της παραγωγής της ενδο-ορχικής τεστοστερόνης.

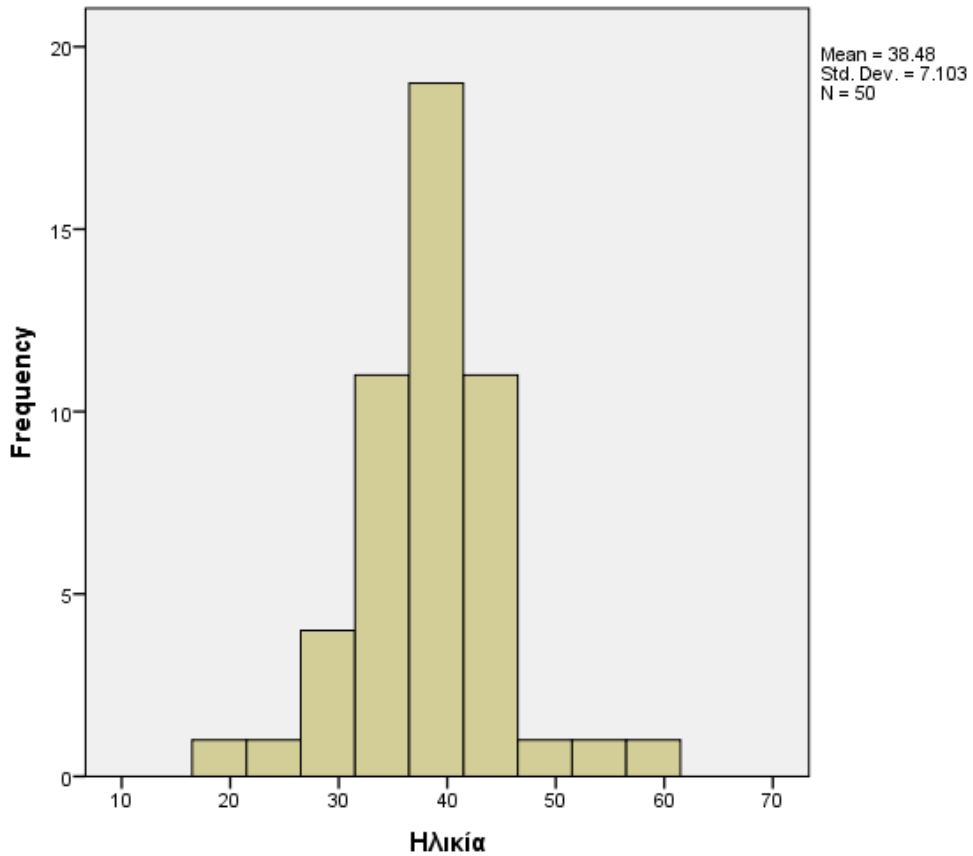
Ακολούθησε ο προεγχειρητικός εργαστηριακός έλεγχος στον οποίο εκτός από τις συνηθισμένες εξετάσεις συμπεριλήφθηκαν ορμονικές εξετάσεις. Ο ορμονικός έλεγχος συμπεριλάμβανε την ωοθυλακιοτρόπο ορμόνη (FSH), την ωχρινοτρόπο ορμόνη (LH), την ολική τεστοστερόνη (TT), την προλακτίνη (PRL) και την οιστραδιόλη (E2).

Όλοι οι άνδρες υποβλήθηκαν σε micro-TESE και ένα μικρό τμήμα ορχικού ιστού στάλθηκε για ιστοπαθολογική εξέταση (DTB). Ένα επιπρόσθετο τμήμα ορχικού ιστού στάλθηκε για επεξεργασία από ειδικό εμβρυολόγο με σκοπό την ανεύρεση σπερματοζωαρίων (TTB). Το υπόλοιπο και μεγαλύτερο τμήμα του ορχικού ιστού στάλθηκε για κρυοσυντήρηση. Τα σπερματοζωάρια που βρέθηκαν στην TTB στάλθηκαν κι αυτά για κρυοσυντήρηση για μελλοντική χρήση σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων της DTB με την TTB. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε δυαδική λογιστική παλινδρόμηση για την αξιολόγηση της διαγνωστικής ακρίβειας του μοντέλου πρόβλεψής μας, προσδιορίζοντας τον αριθμό των ανδρών στους οποίους ανευρέθηκαν σπερματοζωάρια ως δυαδική εξαρτώμενη μεταβλητή. Η προγνωστική αξία όλων των μεταβλητών που αξιολογήθηκαν μεμονωμένα ποσοτικοποιήθηκε ξεχωριστά με το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη (AUC) του λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη (ROC). Μόνο οι ασθενείς που έδωσαν τη συνειδητή συναίνεση τους για τη χειρουργική επέμβαση και την ανώνυμη χρήση των κλινικών δεδομένων τους συμπεριλήφθηκαν σε αυτή τη μελέτη.

Η στατιστική αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το t-test, το chi-square και το fisher's exact. Η μέση τιμή ( $\pm$  τυπική απόκλιση, SD) αναφέρθηκαν για την περιγραφική ανάλυση. Η 16<sup>η</sup> έκδοση του λογισμικού SPSS χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων. Σαν επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε  $p < 0,05$ .

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ηλικιακή κατανομή των ανδρών που συμμετείχαν στη μελέτη αποτυπώνεται στο διάγραμμα 1. Συμμετείχαν 50 άνδρες με ΝΟΑ. Η μέση ηλικία τους ήταν τα 38,5 έτη (τυπική απόκλιση 7,1 και εύρος τιμών 19-61).

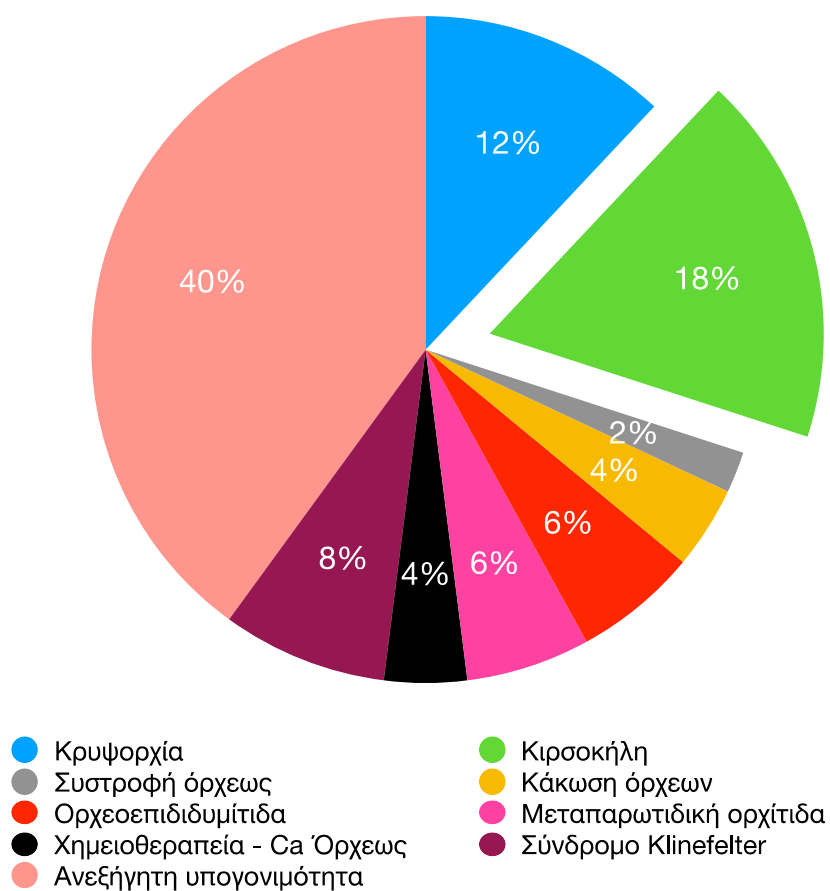


**Διάγραμμα 1:** Η ηλικιακή κατανομή των ανδρών με ΝΟΑ στη μελέτη αυτή.

Αιτιολογικοί παράγοντες της NOA από την κλινική αξιολόγηση των ασθενών παρατίθενται στο διάγραμμα 2 και πίνακα 6. Συχνότερο γνωστό/αποδεδειγμένο αίτιο της μη αποφρακτικής αζωοσπερμίας ήταν το ιστορικό κισσοκήλης, όπου 9 άνδρες είχαν υποβληθεί σε χειρουργική αποκατάσταση στο παρελθόν. Επίσης 6 άνδρες είχαν ιστορικό ορχεοπηξίας λόγω κρυσορχίας και ένας λόγω συστροφής όρχεως. Ιστορικό ορχεοεπιδιδυμίτιδας μικροβιακής αιτιολογίας είχαν 3 άνδρες και μεταπαρωτιδική ορχίτιδα άλλοι 3 άνδρες. Ιστορικό ορχεκτομής λόγω κακοήθους νεοπλασματος όρχεως και συμπληρωματική χημειοθεραπεία αναφέρθηκε σε 3 άνδρες. Από τον έλεγχο του καρυότυπου των ασθενών προέκυψαν 4 άνδρες με σύνδρομο Klinefelter. Στους υπόλοιπους άνδρες δεν ανευρέθηκε καμία αιτία που να δικαιολογεί την μη αποφρακτική αζωοσπερμία (Πίνακας 6, Διάγραμμα 2).

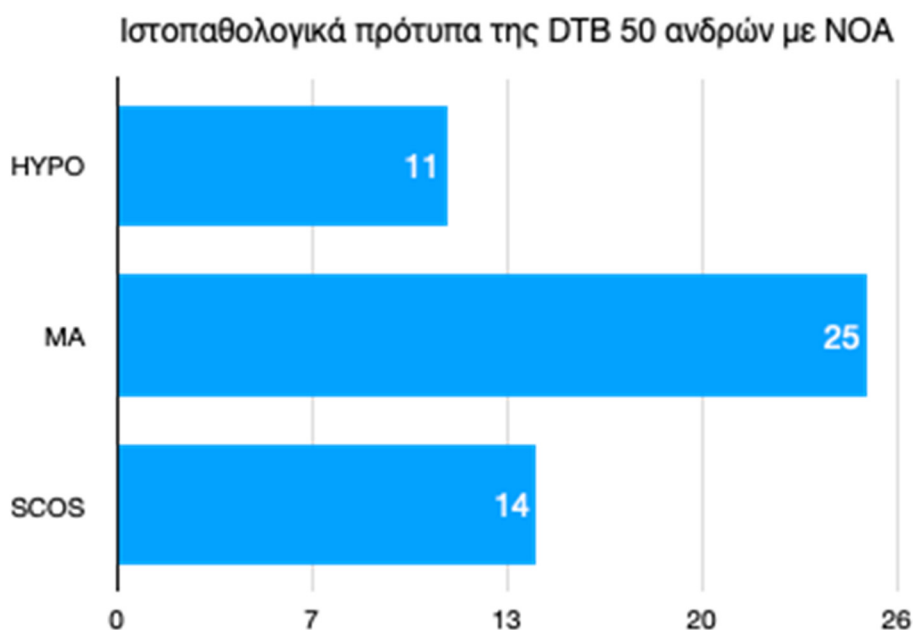
**Πίνακας 6.** Αιτιολογία της μη αποφρακτικής αζωοσπερμίας

Αίτιο μη αποφρακτικής αζωοσπερμίας	Αριθμός ασθενών
Κρυσορχία	6
Κισσοκήλη	9
Συστροφή όρχεως	1
Κάκωση όρχεων	2
Ορχεοεπιδιδυμίτιδα	3
Μεταπαρωτιδική ορχίτιδα	3
Χημειοθεραπεία - Ca Όρχεως	2
Σύνδρομο Klinefelter	4
Ανεξήγητη υπογονιμότητα	20



**Διάγραμμα 2:** Παράγοντες κινδύνου ασθενών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία.

Η DTB πραγματοποιήθηκε σε όλους τους ασθενείς ταυτόχρονα με την TTΒ όπου παρατηρήθηκαν τρία ιστολογικά πρότυπα, η υποσπερματογένεση (HYPO) όπου παρατηρήθηκε σε 11 ασθενείς (22%), αναστολή ωρίμανσης (MA) σε 25 ασθενείς (50%) και σύνδρομο από κύτταρα Sertoli μόνο (SCOS) σε 14 ασθενείς (28%) (Διάγραμμα 3).



DTB: Διαγνωστική βιοψία όρχεως

NOA: Μη αποφρακτική αζωοσπερμία

HYPO: Υποσπερματογένεση

MA: Αναστολή ωρίμανσης

SCOS: Σύνδρομο από κύτταρα Sertoli μόνο

**Διάγραμμα 3.** Ιστοπαθολογικά πρότυπα της DTB σε 50 άνδρες με NOA.



Στην ΤΤΒ βρέθηκαν σπερματοζωάρια τα οποία ανακτήθηκαν σε 22 από τους 50 ασθενείς (44%) οι οποίοι χαρακτηρίστηκαν ως ΤΤΒ θετικοί, ενώ 28 άνδρες ήταν ΤΤΒ αρνητικοί.

Στη συνέχεια έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων της DTB με την ΤΤΒ. Στην DTB αναφέρονταν παρουσία σπερματοζωαρίων σε 11 ασθενείς ενώ στην ΤΤΒ ανευρέθηκαν σπερματοζωάρια σε 22 ασθενείς (Πίνακας 7).

**Πίνακας 7:** Σύγκριση αποτελεσμάτων ανεύρεσης σπερματοζωαρίων μεταξύ της DTB και της ΤΤΒ.

Ανεύρεση σπερματοζωαρίων	DTB	ΤΤΒ
Θετικοί για σπερματοζωάρια	11	22
Αρνητικοί για σπερματοζωάρια	39	28

DTB: Διαγνωστική βιοψία όρχεως

ΤΤΒ: Θεραπευτική βιοψία όρχεως

Στη συνέχεια έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων της TTB με τα ιστοπαθολογικά πρότυπα της DTB (Πίνακας 8). Οι 11 άνδρες από τους 50 που εμφάνισαν HYPO στην DTB ήταν όλοι θετικοί για σπερματοζωάρια στην TTB. Επίσης σπερματοζωάρια ανακτήθηκαν στην TTB σε έναν από τους 14 ασθενείς με SCOS και σε 10 από τους 25 ασθενείς με MA. Η δοκιμή chi-square έδειξε ότι παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερος ρυθμός ανάκτησης σπερματοζωαρίων σε ασθενείς με HYPO σε σύγκριση με εκείνους με SCOS και MA. Σπερματοζωάρια ανακτήθηκαν επιτυχώς στο 100% των ανδρών με HYPO με βάση την DTB, στο 40% των ανδρών με MA και στο 7% των ανδρών με SCOS. Οι άντρες με SCOS στην DTB βρέθηκαν να έχουν πολύ χαμηλότερο ρυθμό ανάκτησης σπερματοζωαρίων σε σύγκριση με τους άνδρες με ιστολογικό πρότυπο HYPO και MA.

**Πίνακας 8:** Σύγκριση αποτελεσμάτων μεταξύ DTB και TTB.

		TTB Αρνητικοί	TTB Θετικοί	Σύνολο	chi- square	sig.
DTB	HYPO	0 (0,0%)	11 (100%)	11	25,939	0.05
	SCOS	13 (92,3%)	1 (7,1%)	14		
	MA	15 (60%)	10(40%)	25		
Σύνολο		28 (56%)	22 (44%)	50		

DTB: Διαγνωστική βιοψία όρχεως

TTB: Θεραπευτική βιοψία όρχεως

HYPO: Υποσπερματογένεση

SCOS: Σύνδρομο από κύτταρα Sertoli μόνο

MA: Αναστολή ωρίμανσης

Με βάση το αποτέλεσμα του παραπάνω ελέγχου παρατηρούμε στατιστικώς σημαντική διαφορά στα ποσοστά της DTB ανάμεσα στους TTB-αρνητικούς και στους TTB-θετικούς.

Η ηλικία, το ορμονικό προφίλ και η διαγνωστική βιοψία όρχεως ανδρών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία παρατίθενται στον πίνακα 9.

**Πίνακας 9:** Η ηλικία, το ορμονικό προφίλ και η διαγνωστική βιοψία όρχεως ανδρών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία.

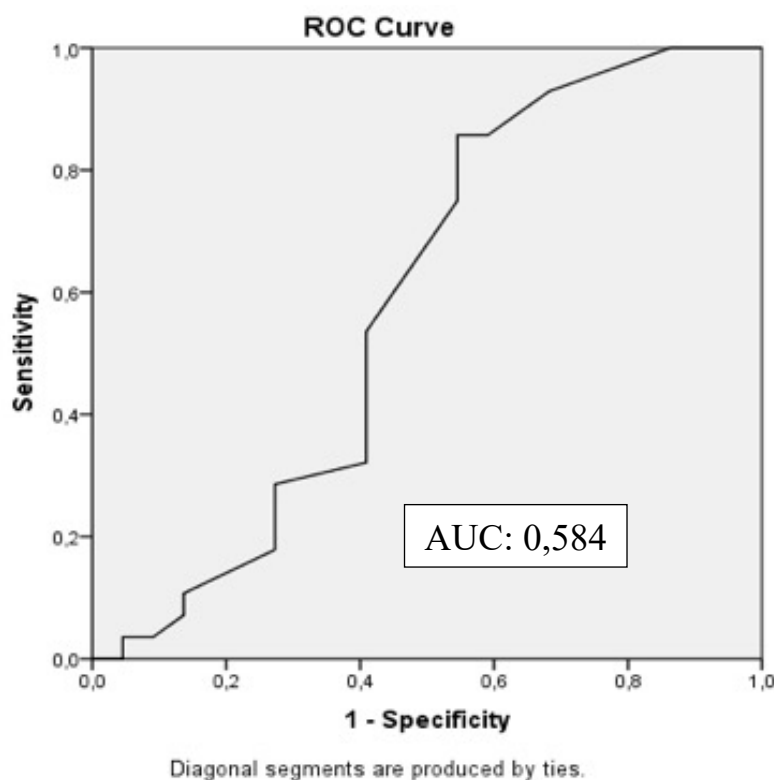
	Σύνολο (N=50)		TTB Αρνητικοί (N=28)		TTB Θετικοί (N=22)		t-test	df	sig.
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD			
<b>Ηλικία</b>	38,5	7,1	39,5	4,9	37,2	9,1	1,036	31	,308
<b>FSH</b> (1,3-19,3) IU/l	20,2	12,9	25,2	13,9	13,8	7,8	3,655	44	,001
<b>LH</b> (1,2-8,6) IU/l	7,7	4,8	8,8	5,6	6,4	3,0	1,976	43	,055
<b>TT</b> (1,8-7,8) ng/ml	2,9	1,1	2,8	1,2	3,1	0,9	-,894	48	,376
<b>PRL</b> (2,6-13,1) ng/ml	7,1	3,1	7,6	3,6	6,3	2,1	1,644	44	,107
<b>E2</b> (73-275) pmol/l	121,2	39,5	124,6	45,6	116,9	30,7	0,675	48	,503
<b>DTB</b> (ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΒΙΟΨΙΑ)	3,0	1,0	3,0	1,1	3,0	1,0	-,155	48	,878

Mean: Μέσο όρο

SD: Standard Deviation, Τυπική απόκλιση

Με βάση τα αποτελέσματα των παραπάνω ελέγχων παρατηρούμε ότι εμφανίζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά στη μέση τιμή της FSH ανάμεσα στους TTB-αρνητικούς και στους TTB-θετικούς, με τους δεύτερους να εμφανίζουν χαμηλότερη μέση τιμή.

Ακολούθησε αξιολόγηση όλων των μεταβλητών μεμονωμένα για τον προσδιορισμό της προγνωστικής τους αξίας στην επιτυχή ανεύρεση σπερματοζωαρίων στην ΤΤΒ. Πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της διαγνωστικής ακρίβειας του μοντέλου πρόβλεψής μας, προσδιορίζοντας τον αριθμό των ανδρών που ήταν θετικοί για τη ανεύρεση σπερματοζωαρίων ως δυαδική εξαρτώμενη μεταβλητή. Η προγνωστική αξία όλων των μεταβλητών που αξιολογήθηκαν μεμονωμένα ποσοτικοποιήθηκε ξεχωριστά με το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη (AUC) του λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη (ROC).



**ROC curve:** Receiver Operating Characteristic Curve, Καμπύλη λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη

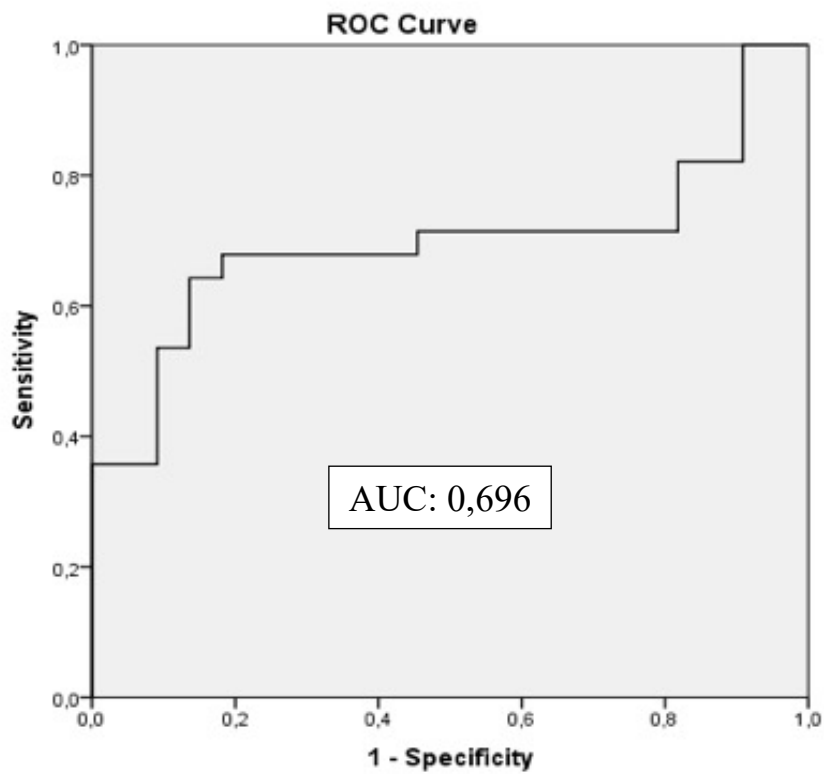
**AUC:** Area Under a Curve, Το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη

**Sensitivity:** Ευαισθησία

**Specificity:** Ειδικότητα

**Διάγραμμα 4:** Η καμπύλη λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη (ROC) της ηλικίας των ασθενών για τη πρόβλεψη της επιτυχούς ανάκτησης σπερματοζωαρίων (TTB+). Το εμβαδόν του χωρίου κάτω από την καμπύλη είναι 0,584.

Με βάση το αποτέλεσμα του παραπάνω ελέγχου δεν μπορούμε να ισχυριστούμε ότι η διακριτική ικανότητα της ηλικίας είναι ικανοποιητική.



**ROC curve:** Receiver Operating Characteristic Curve, Καμπύλη λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη

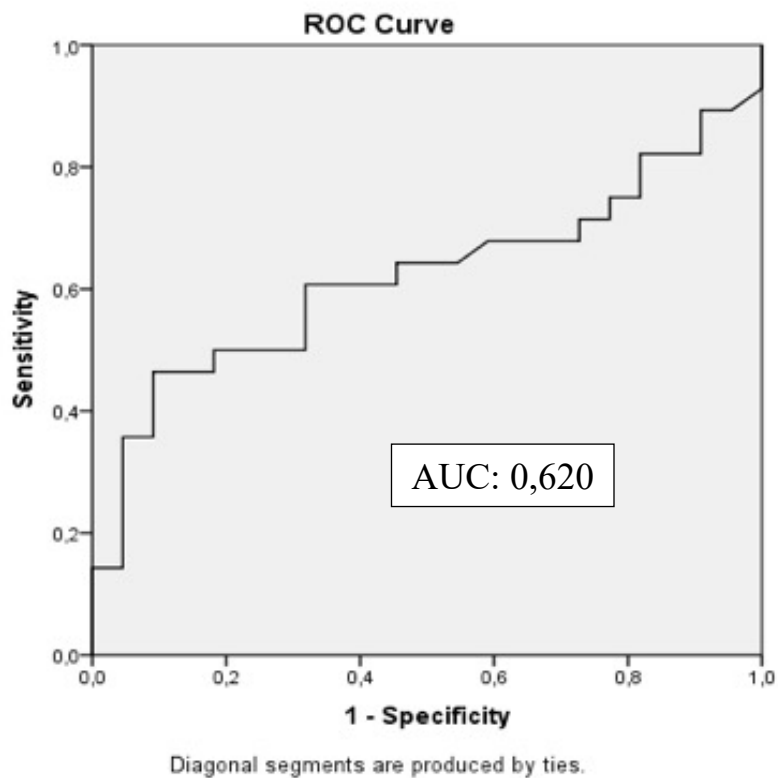
**AUC:** Area Under a Curve, Το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη

**Sensitivity:** Ευαισθησία

**Specificity:** Ειδικότητα

**Διάγραμμα 5:** Η καμπύλη λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη (ROC) της FSH για τη πρόβλεψη της επιτυχούς ανάκτησης σπερματοζωαρίων (TTB+). Το εμβαδόν του χωρίου κάτω από την καμπύλη είναι 0,696.

Με βάση το αποτέλεσμα του παραπάνω ελέγχου παρατηρούμε ότι η FSH έχει χαμηλή διακριτική ικανότητα.



**ROC curve:** Receiver Operating Characteristic Curve, Καμπύλη λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη

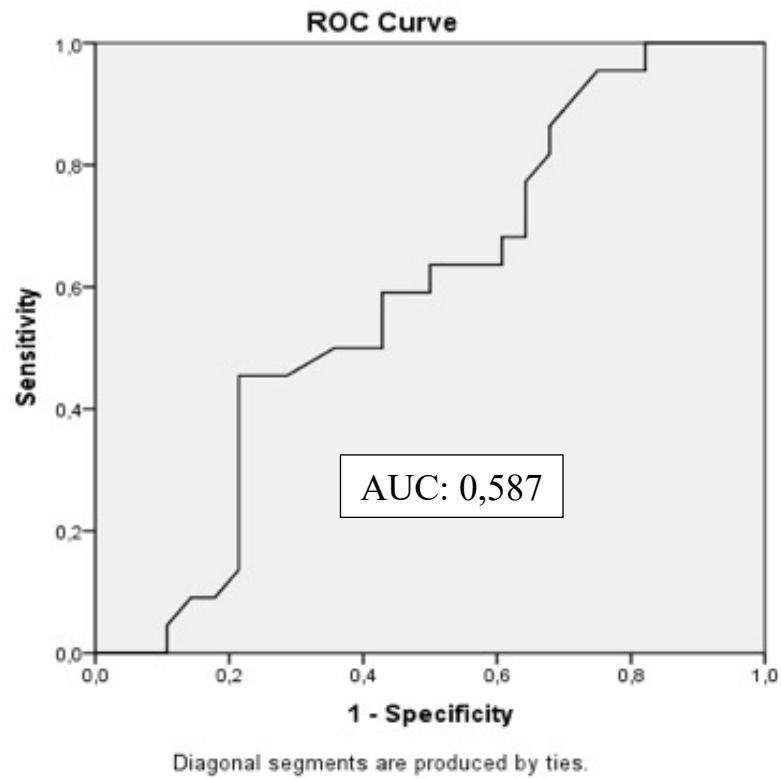
**AUC:** Area Under a Curve, Το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη

**Sensitivity:** Ευαισθησία

**Specificity:** Ειδικότητα

**Διάγραμμα 6:** Η καμπύλη λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη (ROC) της LH για τη πρόβλεψη της επιτυχούς ανάκτησης σπερματοζωαρίων (TTB+). Το εμβαδόν του χωρίου κάτω από την καμπύλη είναι 0,620.

Με βάση το αποτέλεσμα του παραπάνω ελέγχου παρατηρούμε ότι η LH εμφανίζει χαμηλή διακριτική ικανότητα.



**ROC curve:** Receiver Operating Characteristic Curve, Καμπύλη λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη

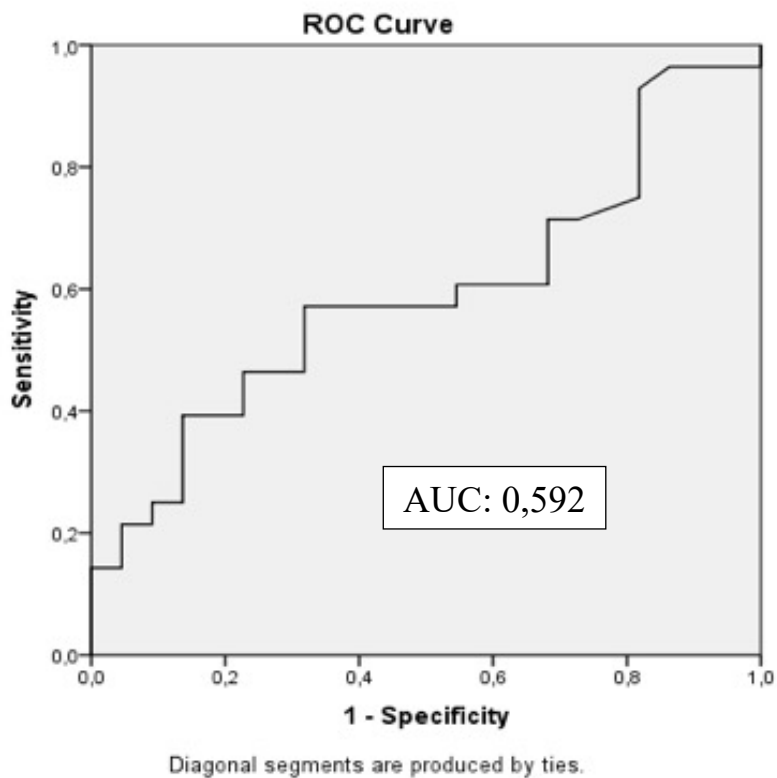
**AUC:** Area Under a Curve, Το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη

**Sensitivity:** Ευαισθησία

**Specificity:** Ειδικότητα

**Διάγραμμα 7:** Η καμπύλη λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη (ROC) της TT για τη πρόβλεψη της επιτυχούς ανάκτησης σπερματοζωαρίων (TTB+). Το εμβαδόν του χωρίου κάτω από την καμπύλη είναι 0,587.

Με βάση το αποτέλεσμα του παραπάνω ελέγχου παρατηρούμε ότι η TT εμφανίζει χαμηλή διακριτική ικανότητα.



**ROC curve:** Receiver Operating Characteristic Curve, Καμπύλη λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη

**AUC:** Area Under a Curve, Το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη

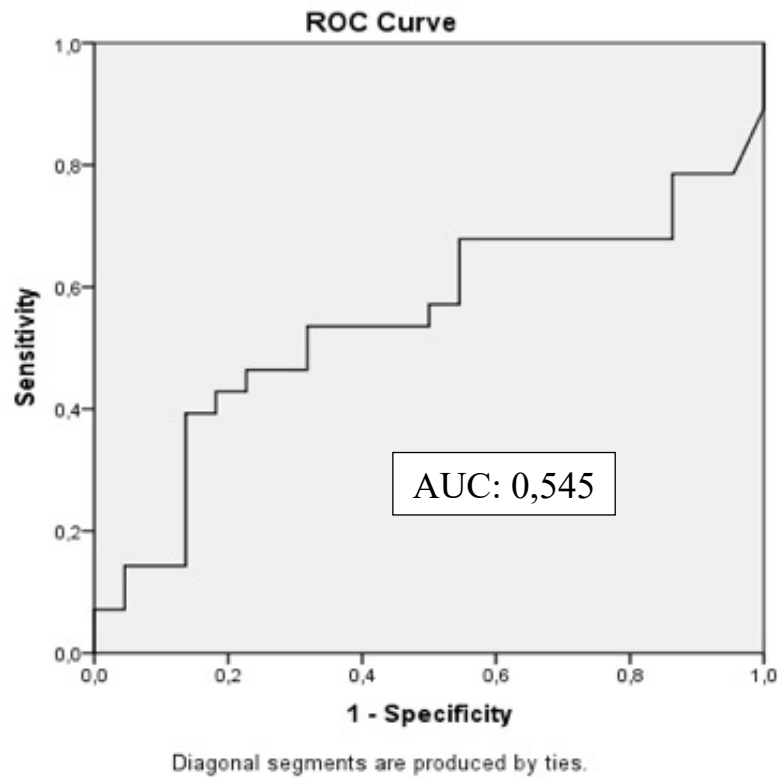
**Sensitivity:** Ευαισθησία

**Specificity:** Ειδικότητα

**Διάγραμμα 8:** Η καμπύλη λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη (ROC) της PRL για τη πρόβλεψη της επιτυχούς ανάκτησης σπερματοζωαρίων (TTB+). Το εμβαδόν του χωρίου κάτω από την καμπύλη είναι 0,592.

Με βάση το αποτέλεσμα του παραπάνω ελέγχου παρατηρούμε ότι η PRL εμφανίζει χαμηλή διακριτική ικανότητα.





**ROC curve:** Receiver Operating Characteristic Curve, Καμπύλη λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη

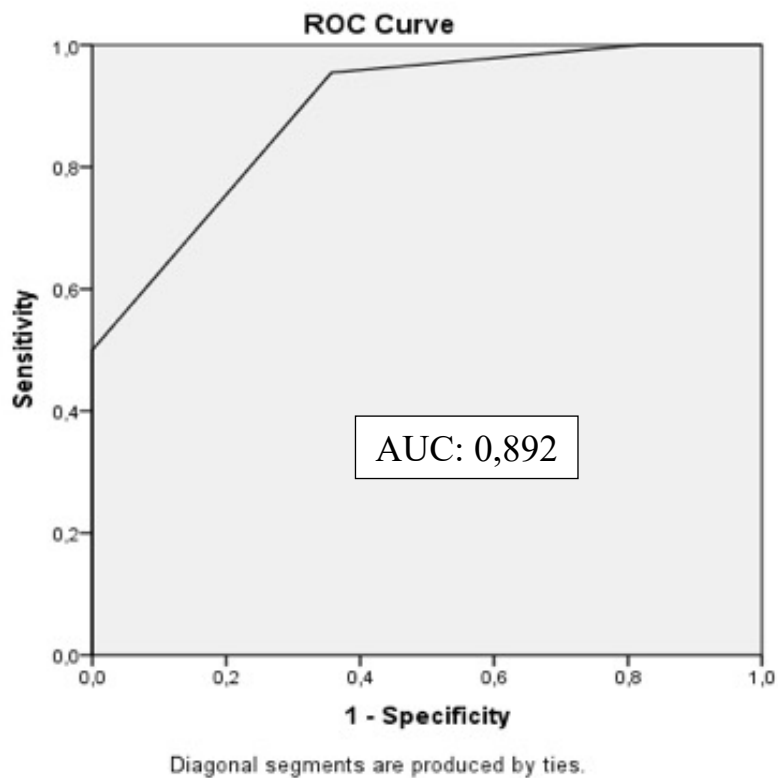
**AUC:** Area Under a Curve, Το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη

**Sensitivity:** Ευαισθησία

**Specificity:** Ειδικότητα

**Διάγραμμα 9:** Η καμπύλη λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη (ROC) της E2 για τη πρόβλεψη της επιτυχούς ανάκτησης σπερματοζωαρίων (TTB+). Το εμβαδόν του χωρίου κάτω από την καμπύλη είναι 0,545.

Με βάση το αποτέλεσμα του παραπάνω ελέγχου παρατηρούμε ότι η E2 εμφανίζει χαμηλή διακριτική ικανότητα.



**ROC curve:** Receiver Operating Characteristic Curve, Καμπύλη λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη

**AUC:** Area Under a Curve, Το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη

**Sensitivity:** Ευαισθησία

**Specificity:** Ειδικότητα

**Διάγραμμα 10:** Η καμπύλη λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη (ROC) της DTB για τη πρόβλεψη της επιτυχούς ανάκτησης σπερματοζωαρίων (TTB+). Το εμβαδόν του χωρίου κάτω από την καμπύλη είναι 0,892.

Με βάση το αποτέλεσμα του παραπάνω ελέγχου παρατηρούμε ότι το εμβαδόν του χωρίου κάτω από την καμπύλη είναι 0.892 που χαρακτηρίζεται πολύ καλό.

**Πίνακας 10:** Η ευαισθησία, η ειδικότητα, η PPV, η NPV και η ακρίβεια με 95% διάστημα εμπιστοσύνης της DTB στην επιτυχή ανεύρεση σπερματοζωαρίων στην TTb (TTb θετικοί για σπερματοζωάρια).

	<b>Ευαισθησία</b> (%) (95% CI)	<b>Ειδικότητα</b> (%) (95% CI)	<b>PPV</b> (%) (95% CI)	<b>NPV</b> (%) (95% CI)	<b>Ακρίβεια</b> (%)
<b>DTB</b>	50 (28,22-71,78)	100 (87,66-100)	100	71,79 (62,63-79,45)	78 (64,04-88,47)

**DTB:** Διαγνωστική βιοψία όρχεως

**TTb:** Θεραπευτική βιοψία όρχεως

**PPV:** Θετική προγνωστική αξία

**NPV:** Αρνητική προγνωστική αξία



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πριν από το 1995, τα ζευγάρια με NOA για τα οποία δεν υπήρχε αιτιολογική θεραπεία και επιθυμούσαν να αποκτήσουν παιδί, αλλά ο σύζυγος είχε διαγνωστεί με μη αποφρακτική αζωοσπερμία, είχαν σαν επιλογή την εξωσωματική γονιμοποίηση με σπερματοζωάρια δότη ή την υιοθεσία ενός παιδιού.

Με την εφαρμογή της θεραπευτικής βιοψίας όρχεως (TTB) με σκοπό την ανεύρεση σπερματοζωαρίων από τους όρχεις ασθενών με NOA, τα ζευγάρια είχαν πλέον την επιλογή να αποκτήσουν βιολογικούς απογόνους με ενδοωαριακές ενέσεις σπερματοζωαρίων (ICSI). Η TTB-ICSI προσφέρεται με επιτυχία για τη θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας που οφείλεται σε NOA.

Η micro-TESE σε συνδυασμό με κύκλους ICSI αναγνωρίζεται επί του παρόντος ως η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη και ωφέλιμη θεραπεία για NOA-άνδρες. Η επιτυχία της τεχνικής αυτής βασίζεται στην παρατήρηση των σπερματικών σωληναρίων κάτω από χειρουργικό μικροσκόπιο και έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να ελαχιστοποιήσει τη βλάβη στον ιστό των όρχεων και να αυξήσει την πιθανότητα επιτυχούς ανάκτησης σπερματοζωαρίων σε σύγκριση με άλλες τεχνικές όπως η συμβατική βιοψία όρχεως (c-TESE). Ωστόσο, το ποσοστό ανάκτησης σπερματοζωαρίων μέσω micro-TESE κυμαίνεται μεταξύ 20 και 60% όπως αναφέρθηκε στην ανασκόπηση της βιβλιογραφίας. Το ποσοστό αυτό παραμένει μη ικανοποιητικό λαμβάνοντας υπόψη τις αρνητικές σωματικές, συναισθηματικές και οικονομικές επιπτώσεις αυτής της διαδικασίας.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, η ενδελεχής κλινική αξιολόγηση των 50 ασθενών ηλικίας από 19 ετών έως 61 ετών έδωσε σημαντικές πληροφορίες και αξιολογήθηκαν κάποιοι αιτιολογικοί παράγοντες που σχετίζονται με την εκδήλωση της μη αποφρακτικής αζωοσπερμίας. Το συχνότερο αίτιο που διαπιστώθηκε ήταν η κισσοκήλη στο 18% των ανδρών και ακολούθησε η κρυσορχία στο 12% των ανδρών. Στο 36% των ανδρών δεν βρέθηκε κανένας αιτιολογικός παράγοντας. Συγκεντρωτικά όλα τα αίτια που καταγράφηκαν αναφέρονται στο διάγραμμα 2. Ιδιαίτερα υψηλό σε σχέση με την διεθνή βιβλιογραφία ήταν το ποσοστό του Συνδρόμου Klinefelter το οποίο διαγνώστηκε στο 8% των ανδρών.

Η DTB πραγματοποιήθηκε σε όλους τους ασθενείς ταυτόχρονα με την TTB με σκοπό τον καθορισμό του βαθμού της ορχικής βλάβης και τον αποκλεισμό πιθανής ενδοσωληναριακής νεοπλασίας από γεννητικά κυττάρα αταξινόμητου τύπου (ITGCNU) η

οποία εμφανίζεται στο 1-5% των υπογόνιμων ανδρών [23]. Το δείγμα του ορχικού ιστού που λήφθηκε για την DTB τοποθετήθηκε σε διάλυμα Bouin και στάλθηκε για ιστολογική εξέταση με τη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Η εξέταση συμπληρώθηκε με ανοσοϊστοχημικό έλεγχο για τον αποκλεισμό νεοπλασίας όρχεως. Όλοι οι άνδρες ήταν αρνητικοί για ITGCNU όπως και για οποιαδήποτε άλλη νεοπλασία γεννητικών κυττάρων του όρχεως.

Στο ιστολογικό παρασκεύασμα της DTB παρατηρήθηκαν σπερματοζωάρια σε 11 ασθενείς. Το δείγμα του ορχικού ιστού που λήφθηκε για την TTB υποβλήθηκε αρχικά σε μηχανική διάσπαση στο οποίο ανευρέθηκαν σπερματοζωάρια σε 17 ασθενείς. Τα υπόλοιπα 35 δείγματα υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε ενζυμική πέψη. Σε 5 δείγματα από αυτά ανευρέθηκαν σπερματοζωάρια. Συνολικά στην TTB βρέθηκαν σπερματοζωάρια σε δείγματα ορχικού ιστού 22 ασθενών. Η αναγνώριση σπερματοζωαρίων αποδεικνύεται ότι είναι επιτυχής σε στατιστικά σημαντικό μεγαλύτερο αριθμό ασθενών στην TTB σε σύγκριση με το αντίστοιχο αποτέλεσμα της DTB. Η ανεύρεση σπερματοζωαρίων στην TTB ήταν επιτυχής στο 100% των ανδρών με υποσπερματογένεση (HYPO) με βάση την DTB, στο 40% των ανδρών με διακοπή ωρίμανσης (MA) και στο 14% των ανδρών με SCOS. Από τα τρία ιστολογικά πρότυπα που παρατηρήθηκαν, οι άνδρες με το ιστολογικό πρότυπο SCOS στην DTB βρέθηκαν να έχουν πολύ χαμηλό ποσοστό ανεύρεσης σπερματοζωαρίων σε σύγκριση με τους άνδρες με υποσπερματογένεση (HYPO) και διακοπή ωρίμανσης (MA).

Σε αυτή τη μελέτη αξιολογήσαμε εάν η ηλικία και τα επίπεδα στο πλάσμα ορμονών μπορεί να επηρεάσουν την ανάκτηση σπερματοζωαρίων στην TTB. Η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των επιπέδων της FSH πλάσματος ήταν 25,2 IU/l και 13,9 IU/l αντίστοιχα στους TTB αρνητικούς για σπερματοζωάρια άνδρες. Στους TTB θετικούς για σπερματοζωάρια τα επίπεδα της FSH ήταν χαμηλότερα (13,8¶7,8 IU/l) σε σχέση με τα επίπεδα στους TTB αρνητικούς άνδρες. Η διαφορά της FSH μεταξύ TTB αρνητικών και TTB θετικών για σπερματοζωάρια ανδρών θεωρείται στατιστικά σημαντική. Επίσης τα επίπεδα της LH, της PRL, της E2 και η ηλικία ήταν υψηλότερα στους TTB αρνητικούς για σπερματοζωάρια άνδρες στη μελέτη μας. Ομοίως, τα επίπεδα της TT ήταν χαμηλότερα σε αυτούς τους άνδρες. Με εξαίρεση τα επίπεδα της FSH δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ηλικία ή στα ορμονικά επίπεδα μεταξύ ανδρών που ήταν TTB θετικοί για σπερματοζωάρια και TTB αρνητικών για σπερματοζωάρια.

Η πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία ενός μοντέλου πρόβλεψης των μεταβλητών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη όπως της ηλικίας, της FSH, της LH, της TT, της PRL, της E2 και της DTB. Η προγνωστική ακρίβεια των προαναφερθέντων μεταβλητών ποσοτικοποιήθηκε ξεχωριστά με το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη (AUC) του λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη (ROC). Η ικανότητα της δοκιμασίας να αναγνωρίσει ορθά ασθενείς TTB αρνητικούς για σπερματοζώαρια και TTB θετικούς για σπερματοζώαρια ήταν κακή για την FSH (AUC=0,696), την LH (AUC=0,620), την TT (AUC=0,587), την PRL (AUC=0,592) και την E2 (AUC=0,545). Αυτά τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι τα επίπεδα της FSH, της LH, της TT, της PRL και της E2 στην πρόβλεψη ανδρών που είναι στην TTB θετικοί για σπερματοζώαρια δεν έχουν προγνωστική αξία.

Η κακή σχέση μεταξύ των επιπέδων της FSH και της σπερματογένεσης μπορεί να εξηγηθεί επειδή η έκκριση και η απελευθέρωση της FSH ελέγχεται από πάρα πολλούς ενδοκρινούς και παρακρινικούς παράγοντες που τελικά συμβάλλουν στα επίπεδα του πλάσματος. Επίσης δεν θα πρέπει να αγνοείται η συμβολή των πολυμορφισμών στον γονότυπο FSHB και τον γονότυπο FSHR που μπορεί οδηγούν σε υψηλότερα από τα αναμενόμενα επίπεδα της FSH σε ορισμένους ασθενείς [20], έτσι ώστε να μην είναι η αναμενόμενη γραμμική σχέση μεταξύ της FSH πλάσματος και της σπερματογένεσης σε όλους τους ασθενείς.

Στη συνέχεια εκτελέσαμε ένα μοντέλο δυαδικής λογιστικής παλινδρόμησης για να διαπιστώσουμε την προγνωστική αξία της DTB σχετικά με την επιτυχή ανάκτηση σπερματοζωαρίων (TTB θετικοί για σπερματοζώαρια). Η προγνωστική αξία της DTB σχετικά με την TTB των ανδρών που είναι θετικοί για σπερματοζώαρια ήταν πολύ καλή (AUC=0,892). Η συχνότητα ανάκτησης σπερματοζωαρίων ήταν σημαντικά υψηλότερη σε ασθενείς με HYPO σε σύγκριση με ασθενείς με SCOS ή MA (100% έναντι 7% και 40%, αντίστοιχα,  $p < 0,05$ ).

Το μοντέλο ήταν στατιστικά σημαντικό ( $p < 0,05$ ) και ταξινόμησε σωστά το 78% των περιπτώσεων με ευαισθησία 50% (95% CI 38,22 – 71,78) και 100% ειδικότητα (95% CI 87,66-100), θετική προγνωστική αξία (PPV) 100%, και αρνητική προγνωστική αξία (NPV) 78%.

Στο αποτέλεσμα της DTB δεν βρέθηκαν σπερματοζώαρια σε 11 ασθενείς ενώ στο αντίστοιχο δείγμα των ίδιων ασθενών στην TTB ανευρέθηκαν. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική επιστημονική ερμηνεία του ίδιου δείγματος ορχικού ιστού από

διαφορετικούς παθολογοανατόμους (339). Ένα δείγμα ορχικού ιστού μετά από βιοψία όρχεως μπορεί να μην αντανακλά τη δυναμική σπερματογένεση σε ολόκληρο τον ιστό των όρχεων. Πράγματι όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία η σπερματογένεση στους όρχεις ασθενών με NOA μπορεί να είναι εστιακή. Επίσης η επεξεργασία του ορχικού ιστού στην TTb που περιλαμβάνει τη μηχανική διάσπαση και την ενζυμική πέψη φαίνεται ότι αυξάνει την πιθανότητα ανεύρεσης σπερματοζωαρίων (428).

Η πραγματοποίηση της DTB πριν από την πραγματοποίηση της TTb δεν συνιστάται από τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ουρολογικής Εταιρίας λόγω περιορισμένης προγνωστικής αξίας. Αυτό συμβαίνει επειδή το αποτέλεσμα της DTB θεωρείται ανεπαρκές στον προσδιορισμό εκείνων των ανδρών με NOA που θα ήταν θετικοί για σπερματοζωάρια στην TTb και υποψήφιοι για ICSI [27]. Όπως φάνηκε και στη μελέτη μας, σχεδόν οι μισοί ασθενείς με NOA που στην DTB δεν αναγνωρίστηκαν σπερματοζωάρια τελικά αυτά παρατηρήθηκαν στην TTb. Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η DTB παρέχει κάποια ένδειξη όχι όμως καθοριστική αναγνώριση των ανδρών με ορχικά σπερματοζωάρια. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι το αρνητικό αποτέλεσμα της DTB δεν θα πρέπει να αποθαρρύνει τους ασθενείς από άλλες μελλοντικές προσπάθειες TTb και περαιτέρω κύκλους ICSI. Διότι η DTB δεν μπορεί με ακρίβεια να αναγνωρίσει τους άνδρες που είναι αρνητικοί για σπερματοζωάρια στην TTb.

Ωστόσο σε ασθενείς με προηγούμενη αποτυχημένη προσπάθεια ανάκτησης σπερματοζωαρίων στην TTb, το αποτέλεσμα της DTB θα μπορούσε να παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για να επιλεγθεί η κατάλληλη χειρουργική τεχνική για την ανάκτηση σπερματοζωαρίων στη νέα προσπάθεια TTb.

Συνεπώς, σε έναν υποπληθυσμό ασθενών με αποτυχία χειρουργικής ανάκτησης σπερματοζωαρίων, οι ασθενείς με ιστολογικό πρότυπο HYPO στην DTB θα μπορούσαν να υποβληθούν σε μια άλλη προσπάθεια c-TESE αντί να εξετάσουν το ενδεχόμενο να υποβληθούν στη πιο επεμβατική και χρονοβόρα χειρουργικά που απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό και χρήση μικροσκοπίου, τη micro-TESE. Ενώ σε πιο σοβαρές περιπτώσεις σε ασθενείς με ιστολογικό πρότυπο SCOS στην DTB η μόνη αποδεκτή μέθοδος ανάκτησης σπερματοζωαρίων είναι η micro-TESE.



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της μελέτης αποδεικνύουν ότι τα αποτελέσματα της DTB ανδρών με NOA διαφέρουν από τα αποτελέσματα της TTb των ίδιων ανδρών. Όπως φάνηκε στα αποτελέσματα η DTB απέτυχε να ανιχνεύσει τους μισούς άνδρες με NOA στους οποίους τελικά ανευρέθηκαν σπερματοζωάρια στην TTb. Για το λόγο αυτό συστήνεται να αποφεύγεται η DTB πριν την TTb. Η DTB θα πρέπει να πραγματοποιείται στον ίδιο χειρουργικό χρόνο με την TTb όπως συστήνεται από τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ουρολογικής Εταιρίας με σκοπό τον προσδιορισμό της σπερματογενετικής βλάβης των όρχεων και τον αποκλεισμό νεοπλασίας.

Η DTB έχει μεγάλη θετική προγνωστική αξία στην επιτυχή ανεύρεση σπερματοζωαρίων στην TTb. Ασθενείς με NOA που είχαν σπερματοζωάρια στην DTB είχαν επίσης σπερματοζωάρια και στην TTb. Ωστόσο ασθενείς με NOA που δεν είχαν σπερματοζωάρια στην DTB, μερικοί από αυτούς είχαν στην TTb. Η DTB δεν μπορεί να προβλέψει μεμονωμένες εστίες ενεργού σπερματογένεσης στον όρχι ασθενών με NOA. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι το αρνητικό αποτέλεσμα της DTB δεν θα πρέπει να αποθαρρύνει τους ασθενείς με NOA για το αποτέλεσμα της TTb ή από νέες μελλοντικές προσπάθειες ανεύρεσης σπερματοζωαρίων και περαιτέρω κύκλους ICSI.

Η DTB θα πρέπει να έχει συμβουλευτικό ρόλο σε σχέση με την TTb καθώς δίνει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την πιθανότητα ανεύρεσης σπερματοζωαρίων, όχι όμως καθοριστική αναγνώριση των ανδρών με ορχικά σπερματοζωάρια. Οι προεγχειρητικές μεταβλητές που μελετήθηκαν όπως ήταν τα επίπεδα του πλάσματος της FSH, της LH, της TT, της PRL, της E2 και η ηλικία των ασθενών δεν μπορούν να προβλέψουν με ακρίβεια την επιτυχή ανεύρεση σπερματοζωαρίων στον όρχι ασθενών με NOA.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Άρης Καλτσάς: Σύγκριση αποτελεσμάτων διαγνωστικής βιοψίας όρχεως και θεραπευτικής βιοψίας όρχεως

(Με την επίβλεψη του κ. Νικολάου Σοφικίτη, Καθηγητή Ουρολογίας)

Η παρούσα μελέτη είχε σαν σκοπό να προσδιορίσει τις διαφορές μεταξύ της διαγνωστικής βιοψίας όρχεως (DTB) και της θεραπευτικής βιοψίας όρχεως (TTB). Επίσης μελετήθηκε η προγνωστική αξία της FSH, της LH, της ολικής τεστοστερόνης (TT), της προλακτίνης (PRL), της οιστραδιόλης (E2) και της DTB στην πρόβλεψη της επιτυχούς ανεύρεσης σπέρματοζωαρίων στην TTB 50 ανδρών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία (NOA) που υποβλήθηκαν σε μικροχειρουργική βιοψία όρχεως (micro-TESE) στην Ουρολογική κλινική του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Αξιολογήθηκαν 50 ασθενείς με NOA από τον Ιανουάριο του 2016 έως τον Δεκέμβριο του 2017. Δυαδική λογιστική παλινδρόμηση χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της διαγνωστικής ακρίβειας του μοντέλου πρόβλεψής μας, προσδιορίζοντας τον αριθμό ανεύρεσης σπέρματοζωαρίων ως δυαδική εξαρτώμενη μεταβλητή. Η προγνωστική αξία όλων των μεταβλητών που αξιολογήθηκαν μεμονωμένα ποσοτικοποιήθηκε με τις εκτιμήσεις της περιοχής κάτω από την καμπύλη (AUC) που προέκυψαν από την καμπύλη λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη (ROC).

Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 38,5 έτη. Η DTB πραγματοποιήθηκε σε όλους τους ασθενείς μας ταυτόχρονα με την TTB με σκοπό τον καθορισμό της σπερματογενετικής βλάβης και τον αποκλεισμό πιθανής ενδοσωληναριακής νεοπλασίας εκ γεννητικών κυττάρων αταξινόμητου τύπου. Στην DTB σπέρματοζωάρια ανακτήθηκαν σε 11 από τους 50 ασθενείς (22%) ενώ στην TTB σε 22 από τους 50 ασθενείς (44%). Στην DTB παρατηρήθηκαν 14 ασθενείς (28%) με σύνδρομο απο κυττάρα Sertoli μόνο (SCOS), ενώ 25 ασθενείς (50%) είχαν σπερματογενετική στάση (MA) και 11 (22%) είχαν υποσπερματογένεση (HYPO). Τα επίπεδα FSH και LH ήταν υψηλότερα και της TT χαμηλότερα στους άνδρες TTB αρνητικούς για σπέρματοζωάρια στη μελέτη μας. Ωστόσο, όταν η προγνωστική ακρίβεια και των τριών μεταβλητών ποσοτικοποιήθηκε ξεχωριστά με τα ποσοστά ξεχωριστά με το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη (AUC) του λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη (ROC) η ικανότητα της δοκιμασίας να προβλέψει σωστά ασθενείς

TTB αρνητικούς για σπερματοζωάρια και TTB θετικούς για σπερματοζωάρια ήταν κακή για την FSH (AUC=0,696), την LH (AUC=0,620) και την TT (AUC=0,587), την PRL (AUC=0,592), την E2 (AUC=0,545) και την ηλικία (AUC=0,584).

Η προβλεπτική ικανότητα της DTB σχετικά με την επιτυχή ανάκτηση σπερματοζωαρίων (TTB+) ήταν πολύ καλή (AUC=0,892) και ταξινομήσε σωστά 78% των περιπτώσεων με ευαισθησία 50% (95% CI 28.22-71.78) και 100% ειδικότητα (95% CI 87.66-100), θετική προγνωστική αξία (PPV) 100%, αρνητική προγνωστική αξία (NPV) 71,79%. Η συχνότητα ανάκτησης σπέρματος ζωαρίων ήταν σημαντικά υψηλότερη σε ασθενείς με HYPO σε σύγκριση με ασθενείς με SCOS ή MA (100% έναντι 7% και 40%, αντίστοιχα,  $p < 0,05$ ).

Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η DTB παρέχει κάποια ένδειξη όχι όμως καθοριστική αναγνώριση των ανδρών με ορχικά σπερματοζωάρια. Επίσης αποδεικνύεται ότι δεν μπορεί να προβλεφθεί η ανεύρεση σπερματοζωαρίων από τα επίπεδα του πλάσματος της FSH, της LH, της TT, της PRL, της E2 και της ηλικίας.

*Λέξεις κλειδιά: ανδρική υπογονιμότητα, μη αποφρακτική αζωοσπερμία, διαγνωστική βιοψία όρχεως, θεραπευτική βιοψία όρχεως, σπερματοζωάρια*

## ABSTRACT

Aris Kaltsas: A comparison of results of diagnostic testicular biopsy and therapeutic testicular biopsy

(Under the supervision of Nikolaos Sofikitis, Professor of Urology)

The aim of the study was to explore the differences between diagnostic testicular biopsy (DTB) and therapeutic testicular biopsy (TTB). We evaluated the role of hormones such as FSH, LH, total testosterone (TT), prolactin (PRL), estradiol (E2), age of men and DTB outcome in the prediction of the TTB result in 50 men with non-obstructive azoospermia who underwent microsurgical testicular sperm extraction (micro-TESE) at the Department of Urology, Ioannina University.

NOA-men (n=50) underwent micro-TESE. The major part of the resected tissue was processed for tissue mincing (TTB-fraction), whereas a minor part of the tissue was processed for hematoxyline-eosin stain (DTB segment). Binary logistic regression analysis (BLRA) was used to evaluate the overall diagnostic accuracy of several parameters to predict the TTB outcome. In this model the presence of sperm in TTB was defined as the binary dependent variable. The predictive value of all variables evaluated individually was quantified by estimates of the area below the curve (AUC) derived from the functional characteristic receiver curve (ROC).

The mean age of the patients was 38.5 years. DTB was performed in all our patients at the same time as TTB in order to determine spermatogenic failure and to rule out possible intratubular germ cell neoplasia of the testis (IGCNU). Spermatozoa were identified in DTB-samples in 11 men (22%) and in TTB-samples in 22 men (44%). Among the DTB-samples of the above 50 men, 14 (28%) men, 25 (50%) men, or 11(22%) men demonstrated Sertoli cell-only syndrome (SCOS), maturation arrest (MA), or hypospermatogenesis (HYPO), respectively.

Using BLRA, it was found that men positive or negative for sperm in TTB could not be identified with high diagnostic accuracy by the peripheral serum levels of a) FSH (Area Under the ROC [Receiver Operating Characteristic Curve]; AUC; AUC= 0.696), of b) LH (AUC= 0.620), of c) testosterone (AUC=0.587), of d) prolactine (AUC=0.592), of e) estradiol (0.545) and of f) age (AUC=0.584). In contrast, the ability of DTB to identify the subpopulation of men with positive TTB was relatively high (AUC= 0.892). DTB had

an overall diagnostic accuracy of 78% to identify men positive or negative in TTB. The sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value was 50% (95% CI 28.22-71.78), 100%(CI 87.66-100), 100%, and 71.79%, respectively. The sperm recovery rate in TTB samples was significantly larger in HYPO-men than in men with SCOS or MA (100% vs 7% or 40%, respectively;  $p < 0.05$ ; Chi square test-Yates' correction).

Among several hormonal or pathological parameters, DTB has the higher diagnostic accuracy to predict the micro-TESE outcome.

*Keywords: male infertility, non obstructive azoospermia, diagnostic testicular biopsy, therapeutic testicular biopsy, spermatozoa.*

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Hum Reprod.* 2017;32(9):1786-801.
2. Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem.* 2018;62:2-10.
3. Lotti F, Maggi M. Ultrasound of the male genital tract in relation to male reproductive health. *Hum Reprod Update.* 2015;21(1):56-83.
4. Hamada A, Esteves SC, Nizza M, et al. Unexplained male infertility: diagnosis and management. *Int Braz J Urol.* 2012;38(5):576-94.
5. Leaver RB. Male infertility: an overview of causes and treatment options. *Br J Nurs.* 2016;25(18):S35-S40.
6. Stephen EH, Chandra A. Declining estimates of infertility in the United States: 1982-2002. *Fertil Steril.* 2006;86(3):516-23.
7. Berookhim BM, Schlegel PN. Azoospermia due to spermatogenic failure. *Urol Clin North Am.* 2014;41(1):97-113.
8. Jarow JP, Espeland MA, Lipshultz LI. Evaluation of the azoospermic patient. *J Urol.* 1989;142(1):62-5.
9. Jaffe TM, Kim ED, Hoekstra TH, et al. Sperm pellet analysis: a technique to detect the presence of sperm in men considered to have azoospermia by routine semen analysis. *J Urol.* 1998;159(5):1548-50.
10. Lindsay KS, Floyd I, Swan R. Classification of azoospermic samples. *Lancet.* 1995;345(8965):1642.
11. Gudeloglu A, Parekattil SJ. Update in the evaluation of the azoospermic male. *Clinics (Sao Paulo).* 2013;68 Suppl 1:27-34.
12. Baker K, Sabanegh E, Jr. Obstructive azoospermia: reconstructive techniques and results. *Clinics (Sao Paulo).* 2013;68 Suppl 1:61-73.
13. Chiba K, Enatsu N, Fujisawa M. Management of non-obstructive azoospermia. *Reprod Med Biol.* 2016;15(3):165-73.
14. Palermo G, Joris H, Devroey P, et al. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 1992;340(8810):17-8.
15. Schlegel PN. Evaluation of male infertility. *Minerva Ginecol.* 2009;61(4):261-83.

16. Schoor RA, Elhanbly S, Niederberger CS, et al. The role of testicular biopsy in the modern management of male infertility. *J Urol*. 2002;167(1):197-200.
17. Levran D, Ginath S, Farhi J, et al. Timing of testicular sperm retrieval procedures and in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril*. 2001;76(2):380-3.
18. Wheeler R. *Λειτουργική Ιστολογία*. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης; 2002.
19. Tortora GJ, Derickson BH. *Principles of Anatomy and Physiology*. 15th ed: Wiley; 2018.
20. Male Reproductive System [Available from: <https://my.clevelandclinic.org/health/articles/9117-male-reproductive-system>.
21. Johnson L, Petty CS, Neaves WB. Influence of age on sperm production and testicular weights in men. *J Reprod Fertil*. 1984;70(1):211-8.
22. Tsili AC, Sofikitis N, Stiliara E, et al. MRI of testicular malignancies. *Abdom Radiol (NY)*. 2019;44(3):1070-82.
23. Μελέκος ΜΔ. *Σύγχρονη Ουρολογία*. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης; 2005.
24. Van De Graaf K. *Human anatomy* 2001.
25. VanPutte C, Russo A, Regan J. *Seeley's Anatomy and Physiology*: McGraw-Hill Education; 2010.
26. MacLennan GT, Stempen PH, Hinman F. *Hinman's atlas of urosurgical anatomy*. Philadelphia (Pa.): Elsevier/Saunders; 2012.
27. Jarow JP, Ogle A, Kaspar J, et al. Testicular artery ramification within the inguinal canal. *J Urol*. 1992;147(5):1290-2.
28. Kavoussi LR, McDougal WS, Partin AW, et al. *Campbell-Walsh Urology 11th ed* 2016 2016.
29. Sobotta J, Putz RV, Pabst R. *Sobotta Atlas of human anatomy München*: Urban and Fischer; 2006.
30. Dahl EV, Herrick JF. A vascular mechanism for maintaining testicular temperature by counter-current exchange. *Surg Gynecol Obstet*. 1959;108(6):697-705.
31. Δεληβελιώτης Χ. *Ουρολογία*. 2η ed: Broken; 2018.
32. Bayard F, Boulard PY, Huc A, et al. Arterio-venous transfer of testosterone in the spermatic cord of man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1975;40(2):345-6.



33. Agger P. Scrotal and testicular temperature: its relation to sperm count before and after operation for varicocele. *Fertil Steril*. 1971;22(5):286-97.
34. Goldstein M, Eid JF. Elevation of intratesticular and scrotal skin surface temperature in men with varicocele. *J Urol*. 1989;142(3):743-5.
35. Marshall FF. Anomalies associated with cryptorchidism. *Urol Clin North Am*. 1982;9(3):339-47.
36. Davis CM, Papadopoulos V, Sommers CL, et al. Differential expression of extracellular matrix components in rat Sertoli cells. *Biol Reprod*. 1990;43(5):860-9.
37. Collin O, Lissbrant E, Bergh A. Atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide and c-type natriuretic peptide: effects on testicular microcirculation and immunohistochemical localization. *Int J Androl*. 1997;20(1):55-60.
38. Milgrom E, de Roux N, Ghinea N, et al. Gonadotrophin and thyrotrophin receptors. *Horm Res*. 1997;48 Suppl 4:33-7.
39. Desjardins C. The microcirculation of the testis. *Ann N Y Acad Sci*. 1989;564:243-9.
40. Patel AP. Anatomy and physiology of chronic scrotal pain. *Transl Androl Urol*. 2017;6(Suppl 1):S51-S6.
41. Turnbull AV, Rivier C. Inhibition of gonadotropin-induced testosterone secretion by the intracerebroventricular injection of interleukin-1 beta in the male rat. *Endocrinology*. 1997;138(3):1008-13.
42. Sibert L, Safsaf A, Rigaud J, et al. [Epididymal and testicular chronic pain]. *Prog Urol*. 2010;20(12):962-6.
43. Holstein AF, Orlandini GE, Moller R. Distribution and fine structure of the lymphatic system in the human testis. *Cell Tissue Res*. 1979;200(1):15-27.
44. Lee KH, Hess RA, Bahr JM, et al. Estrogen receptor alpha has a functional role in the mouse rete testis and efferent ductules. *Biol Reprod*. 2000;63(6):1873-80.
45. Miller SR, Cherrington NJ. Transepithelial transport across the blood-testis barrier. *Reproduction*. 2018;156(6):R187-R94.
46. Graham SD, Keane TE, Glenn JF. Glenn's urologic surgery. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer / Lippincott Williams & Wilkins; 2010.
47. Cornwall GA. New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update*. 2009;15(2):213-27.

48. Johnson L, Varner DD. Effect of daily spermatozoan production but not age on transit time of spermatozoa through the human epididymis. *Biol Reprod.* 1988;39(4):812-7.
49. Cooper TG. In defense of a function for the human epididymis. *Fertil Steril.* 1990;54(6):965-75.
50. Hinton BT, Palladino MA, Rudolph D, et al. The epididymis as protector of maturing spermatozoa. *Reprod Fertil Dev.* 1995;7(4):731-45.
51. Foldes RG, Bedford JM. Biology of the scrotum. I. Temperature and androgen as determinants of the sperm storage capacity of the rat cauda epididymidis. *Biol Reprod.* 1982;26(4):673-82.
52. Mescher AL, Junqueira LCU, Mescher AL. *Junqueira's basic histology : text and atlas.* 2018.
53. Gray S, Russo K. *Gray's anatomy.* Woodstock, Ill.: Dramatic Publishing; 2008.
54. Hall JE. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology.* [S.l.]: Elsevier - Health Science; 2020.
55. Nguyen HT, Etzell J, Turek PJ. Normal human ejaculatory duct anatomy: a study of cadaveric and surgical specimens. *J Urol.* 1996;155(5):1639-42.
56. Aumuller G, Riva A. Morphology and functions of the human seminal vesicle. *Andrologia.* 1992;24(4):183-96.
57. Daudin M, Bieth E, Bujan L, et al. Congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, and implications for genetic counseling. *Fertil Steril.* 2000;74(6):1164-74.
58. Aaron L, Franco OE, Hayward SW. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *Urol Clin North Am.* 2016;43(3):279-88.
59. McNeal JE. Anatomy of the prostate and morphogenesis of BPH. *Prog Clin Biol Res.* 1984;145:27-53.
60. Chen J, Zhao HF, Xu ZS. The prostate has secretory dysfunction for category IIIA and IIIB prostatitis. *J Urol.* 2007;177(6):2166-9; discussion 9.
61. Verze P, Cai T, Lorenzetti S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nat Rev Urol.* 2016;13(7):379-86.

62. Zukerman Z, Weiss DB, Orvieto R. Does preejaculatory penile secretion originating from Cowper's gland contain sperm? *J Assist Reprod Genet.* 2003;20(4):157-9.
63. The Pathway of Sperm [Available from:  
<https://www.sps186.org/downloads/basic/68879/hte182>.
64. Plant TM. Hypothalamic control of the pituitary-gonadal axis in higher primates: key advances over the last two decades. *J Neuroendocrinol.* 2008;20(6):719-26.
65. Hayes F, Dwyer A, Pitteloud N. Hypogonadotropic Hypogonadism (HH) and Gonadotropin Therapy. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. *Endotext.* South Dartmouth (MA)2000.
66. Bick D, Franco B, Sherins RJ, et al. Brief report: intragenic deletion of the KALIG-1 gene in Kallmann's syndrome. *N Engl J Med.* 1992;326(26):1752-5.
67. Dode C, Levilliers J, Dupont JM, et al. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet.* 2003;33(4):463-5.
68. Clarke IJ. Control of GnRH secretion: one step back. *Front Neuroendocrinol.* 2011;32(3):367-75.
69. Goffin V, Binart N, Touraine P, et al. Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annu Rev Physiol.* 2002;64:47-67.
70. Wennbo H, Kindblom J, Isaksson OG, et al. Transgenic mice overexpressing the prolactin gene develop dramatic enlargement of the prostate gland. *Endocrinology.* 1997;138(10):4410-5.
71. Steger RW, Chandrashekar V, Zhao W, et al. Neuroendocrine and reproductive functions in male mice with targeted disruption of the prolactin gene. *Endocrinology.* 1998;139(9):3691-5.
72. Tsutsumi R, Webster NJ. GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction. *Endocr J.* 2009;56(6):729-37.
73. Buzzard JJ, Morrison JR, O'Bryan MK, et al. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biol Reprod.* 2000;62(3):664-9.
74. Bex F, Bartke A, Goldman BD, et al. Prolactin, growth hormone, luteinizing hormone receptors, and seasonal changes in testicular activity in the golden hamster. *Endocrinology.* 1978;103(6):2069-80.
75. Selva DM, Hammond GL. Thyroid hormones act indirectly to increase sex hormone-binding globulin production by liver via hepatocyte nuclear factor-4alpha. *J Mol Endocrinol.* 2009;43(1):19-27.

76. Grasa MDM, Gulfo J, Camps N, et al. Modulation of SHBG binding to testosterone and estradiol by sex and morbid obesity. *Eur J Endocrinol*. 2017;176(4):393-404.
77. Levallet J, Pakarinen P, Huhtaniemi IT. Follicle-stimulating hormone ligand and receptor mutations, and gonadal dysfunction. *Arch Med Res*. 1999;30(6):486-94.
78. Tapanainen JS, Aittomaki K, Min J, et al. Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nat Genet*. 1997;15(2):205-6.
79. Itman C, Mendis S, Barakat B, et al. All in the family: TGF-beta family action in testis development. *Reproduction*. 2006;132(2):233-46.
80. Oduwole OO, Peltoketo H, Huhtaniemi IT. Role of Follicle-Stimulating Hormone in Spermatogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:763.
81. Sulyok S, Wankell M, Alzheimer C, et al. Activin: an important regulator of wound repair, fibrosis, and neuroprotection. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;225(1-2):127-32.
82. Shupnik MA, Schreihof DA. Molecular aspects of steroid hormone action in the male reproductive axis. *J Androl*. 1997;18(4):341-4.
83. Santen RJ. Is aromatization of testosterone to estradiol required for inhibition of luteinizing hormone secretion in men? *J Clin Invest*. 1975;56(6):1555-63.
84. Hayes FJ, Pitteloud N, DeCruz S, et al. Importance of inhibin B in the regulation of FSH secretion in the human male. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(11):5541-6.
85. Vermeulen A, Kaufman JM. Ageing of the hypothalamo-pituitary-testicular axis in men. *Horm Res*. 1995;43(1-3):25-8.
86. Mulligan T, Iranmanesh A, Johnson ML, et al. Aging alters feed-forward and feedback linkages between LH and testosterone in healthy men. *Am J Physiol*. 1997;273(4):R1407-13.
87. Jameson JL, Kasper DL, Fauci AS, et al. *Harrison's principles of internal medicine* 2018.
88. Schagdarsurengin U, Western P, Steger K, et al. Developmental origins of male subfertility: role of infection, inflammation, and environmental factors. *Semin Immunopathol*. 2016;38(6):765-81.
89. Koopman P, Bullejos M, Bowles J. Regulation of male sexual development by Sry and Sox9. *J Exp Zool*. 2001;290(5):463-74.
90. Biason-Lauber A. The Battle of the Sexes: Human Sex Development and Its Disorders. *Results Probl Cell Differ*. 2016;58:337-82.

91. Svingen T, Koopman P. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes Dev.* 2013;27(22):2409-26.
92. Fine C. *Delusions of gender the real science behind sex difference.* London: Icon; 2012.
93. Biason-Lauber A. Control of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2010;24(2):163-86.
94. Fluck CE, Meyer-Boni M, Pandey AV, et al. Why boys will be boys: two pathways of fetal testicular androgen biosynthesis are needed for male sexual differentiation. *Am J Hum Genet.* 2011;89(2):201-18.
95. Fleming A, Vilain E. The endless quest for sex determination genes. *Clin Genet.* 2005;67(1):15-25.
96. She ZY, Yang WX. Sry and SoxE genes: How they participate in mammalian sex determination and gonadal development? *Semin Cell Dev Biol.* 2017;63:13-22.
97. Larney C, Bailey TL, Koopman P. Switching on sex: transcriptional regulation of the testis-determining gene Sry. *Development.* 2014;141(11):2195-205.
98. Parker KL, Schimmer BP, Schedl A. Genes essential for early events in gonadal development. *Cell Mol Life Sci.* 1999;55(6-7):831-8.
99. Jakob S, Lovell-Badge R. Sex determination and the control of Sox9 expression in mammals. *FEBS J.* 2011;278(7):1002-9.
100. Jo A, Denduluri S, Zhang B, et al. The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases. *Genes Dis.* 2014;1(2):149-61.
101. Moniot B, Declosmenil F, Barrionuevo F, et al. The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. *Development.* 2009;136(11):1813-21.
102. Ludbrook LM, Harley VR. Sex determination: a 'window' of DAX1 activity. *Trends Endocrinol Metab.* 2004;15(3):116-21.
103. Jameson SA, Lin YT, Capel B. Testis development requires the repression of Wnt4 by Fgf signaling. *Dev Biol.* 2012;370(1):24-32.
104. DiNapoli L, Capel B. SRY and the standoff in sex determination. *Mol Endocrinol.* 2008;22(1):1-9.
105. Martin LJ. Cell interactions and genetic regulation that contribute to testicular Leydig cell development and differentiation. *Mol Reprod Dev.* 2016;83(6):470-87.

106. Zimmermann S, Steding G, Emmen JM, et al. Targeted disruption of the *Insl3* gene causes bilateral cryptorchidism. *Mol Endocrinol*. 1999;13(5):681-91.
107. Mamoulakis C, Georgiou I, Dimitriadis F, et al. Genetic analysis of the human Insulin-like 3 gene: absence of mutations in a Greek paediatric cohort with testicular maldescent. *Andrologia*. 2014;46(9):986-96.
108. Grino PB, Griffin JE, Wilson JD. Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology*. 1990;126(2):1165-72.
109. Mamoulakis C, Antypas S, Sofras F, et al. Testicular Descent. *Hormones (Athens)*. 2015;14(4):515-30.
110. Josso N. Antimullerian hormone: new perspectives for a sexist molecule. *Endocr Rev*. 1986;7(4):421-33.
111. Behringer RR, Cate RL, Froelick GJ, et al. Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing mullerian inhibiting substance. *Nature*. 1990;345(6271):167-70.
112. Val P, Lefrancois-Martinez AM, Veyssiere G, et al. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nucl Recept*. 2003;1(1):8.
113. Andersson AM, Toppari J, Haavisto AM, et al. Longitudinal reproductive hormone profiles in infants: peak of inhibin B levels in infant boys exceeds levels in adult men. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(2):675-81.
114. Clement K, Vaisse C, Lahlou N, et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*. 1998;392(6674):398-401.
115. Caprio M, Isidori AM, Carta AR, et al. Expression of functional leptin receptors in rodent Leydig cells. *Endocrinology*. 1999;140(11):4939-47.
116. Kiess W, Reich A, Meyer K, et al. A role for leptin in sexual maturation and puberty? *Horm Res*. 1999;51 Suppl 3:55-63.
117. Langford GA, Heller CG. Fine structure of muscle cells of the human testicular capsule: basis of testicular contractions. *Science*. 1973;179(4073):573-5.
118. Griswold MD. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev*. 2016;96(1):1-17.
119. Xiao X, Mruk DD, Wong CK, et al. Germ cell transport across the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Physiology (Bethesda)*. 2014;29(4):286-98.

120. Hirsh AV. The anatomical preparations of the human testis and epididymis in the Glasgow Hunterian Anatomical Collection. *Hum Reprod Update*. 1995;1(5):515-21.
121. Lennox B, Ahmad KN. The total length of tubules in the human testis. *J Anat*. 1970;107(Pt 1):191.
122. Huhtaniemi I, Pelliniemi LJ. Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1992;201(2):125-40.
123. Teerds KJ, Dorrington JH. Localization of transforming growth factor beta 1 and beta 2 during testicular development in the rat. *Biol Reprod*. 1993;48(1):40-5.
124. Le Roy C, Lejeune H, Chuzel F, et al. Autocrine regulation of Leydig cell differentiated functions by insulin-like growth factor I and transforming growth factor beta. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1999;69(1-6):379-84.
125. Kaler LW, Neaves WB. Attrition of the human Leydig cell population with advancing age. *Anat Rec*. 1978;192(4):513-8.
126. James VHT, Serio M, Martini L. The endocrine function of the human testis. 1973.
127. Luo L, Chen H, Zirkin BR. Leydig cell aging: steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and cholesterol side-chain cleavage enzyme. *J Androl*. 2001;22(1):149-56.
128. Stocco DM. Intramitochondrial cholesterol transfer. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1486(1):184-97.
129. Culty M, Li H, Boujrad N, et al. In vitro studies on the role of the peripheral-type benzodiazepine receptor in steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1999;69(1-6):123-30.
130. West LA, Horvat RD, Roess DA, et al. Steroidogenic acute regulatory protein and peripheral-type benzodiazepine receptor associate at the mitochondrial membrane. *Endocrinology*. 2001;142(1):502-5.
131. Miller WL. Disorders of androgen biosynthesis. *Semin Reprod Med*. 2002;20(3):205-16.
132. Payne AH, Youngblood GL. Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol Reprod*. 1995;52(2):217-25.
133. Ascoli M, Segaloff DL. Regulation of the differentiated functions of Leydig tumor cells by epidermal growth factor. *Ann N Y Acad Sci*. 1989;564:99-115.
134. Saez JM, Avallet O, Lejeune H, et al. Cell-cell communication in the testis. *Horm Res*. 1991;36(3-4):104-15.

135. Darney KJ, Jr., Zirkin BR, Ewing LL. Testosterone autoregulation of its biosynthesis in the rat testis: inhibition of 17 alpha-hydroxylase activity. *J Androl.* 1996;17(2):137-42.
136. Chapple CR, Steers WD, Evans CP. *Urologic Principles and Practice* 2020.
137. Mruk DD, Cheng CY. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev.* 2004;25(5):747-806.
138. Lie PP, Cheng CY, Mruk DD. The biology of the desmosome-like junction a versatile anchoring junction and signal transducer in the seminiferous epithelium. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2011;286:223-69.
139. Mruk DD, Cheng CY. The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. *Endocr Rev.* 2015;36(5):564-91.
140. Fritz IB, Rommerts FG, Louis BG, et al. Regulation by FSH and dibutyryl cyclic AMP of the formation of androgen-binding protein in Sertoli cell-enriched cultures. *J Reprod Fertil.* 1976;46(1):17-24.
141. Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, et al. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;109(3-5):323-30.
142. Dimitriadis F, Tsiampali C, Chaliasos N, et al. The Sertoli cell as the orchestra conductor of spermatogenesis: spermatogenic cells dance to the tune of testosterone. *Hormones (Athens).* 2015;14(4):479-503.
143. Manzoor SM, Sattar A, Hashim R, et al. Serum inhibin B as a diagnostic marker of male infertility. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2012;24(3-4):113-6.
144. Xiong X, Wang A, Liu G, et al. Effects of p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene on the expressions of transferrin and androgen-binding protein in rat Sertoli cells. *Environ Res.* 2006;101(3):334-9.
145. Partin AW, Dmochowski RR, Kavoussi LR, et al. *Campbell-Walsh-Wein Urology.* Philadelphia: Elsevier; 2020.
146. Weiss L, Greep RO, Greep RO. *Histology.* New York: McGraw-Hill; 1977.
147. Hermo L, Lalli M, Clermont Y. Arrangement of connective tissue components in the walls of seminiferous tubules of man and monkey. *Am J Anat.* 1977;148(4):433-45.
148. Toyama Y. Actin-like filaments in the myoid cell of the testis. *Cell Tissue Res.* 1977;177(2):221-6.



149. Tung PS, Skinner MK, Fritz IB. Fibronectin synthesis is a marker for peritubular cell contaminants in Sertoli cell-enriched cultures. *Biol Reprod.* 1984;30(1):199-211.
150. Skinner MK, Fetterolf PM, Anthony CT. Purification of a paracrine factor, P-Mod-S, produced by testicular peritubular cells that modulates Sertoli cell function. *J Biol Chem.* 1988;263(6):2884-90.
151. de Winter JP, Vanderstichele HM, Verhoeven G, et al. Peritubular myoid cells from immature rat testes secrete activin-A and express activin receptor type II in vitro. *Endocrinology.* 1994;135(2):759-67.
152. Dym M, Fawcett DW. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod.* 1970;3(3):308-26.
153. Stanton PG. Regulation of the blood-testis barrier. *Semin Cell Dev Biol.* 2016;59:166-73.
154. Tung KS, Unanue ER, Dixon FJ. Pathogenesis of experimental allergic orchitis. II. The role of antibody. *J Immunol.* 1971;106(6):1463-72.
155. Brown PC, Dorling J, Glynn LE. Ultrastructural changes in experimental allergic orchitis in guinea-pigs. *J Pathol.* 1972;106(4):229-33.
156. Dhidsa DS. Immunological aspects of infertility and fertility regulation. New York: Elsevier/North Holland; 1980 1980.
157. Lipshultz LI, Howards SS, Niederberger CS. Infertility in the male. Cambridge, UK; New York: Cambridge University Press; 2009.
158. Diemer T, Hales DB, Weidner W. Immune-endocrine interactions and Leydig cell function: the role of cytokines. *Andrologia.* 2003;35(1):55-63.
159. Pelletier RM. The blood-testis barrier: the junctional permeability, the proteins and the lipids. *Prog Histochem Cytochem.* 2011;46(2):49-127.
160. Cheng CY, Mruk DD. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol Rev.* 2012;64(1):16-64.
161. Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev.* 1972;52(1):198-236.
162. Misell LM, Holochwost D, Boban D, et al. A stable isotope-mass spectrometric method for measuring human spermatogenesis kinetics in vivo. *J Urol.* 2006;175(1):242-6; discussion 6.
163. Heller CH, Clermont Y. Kinetics of the Germinal Epithelium in Man. *Recent Prog Horm Res.* 1964;20:545-75.

164. Schulze W, Salzbrunn A. Spatial and Quantitative Aspects of Spermatogenic Tissue in Primates. 1992;267-83.
165. Steinberger A, Jason W, Heindel JJ, et al. Hormone Interactions in the Sertoli Cells. *in vitro In Vitro*. 1979;15(1):23-31.
166. Kerr JB. Functional cytology of the human testis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1992;6(2):235-50.
167. Ewing LL, Davis JC, Zirkin BR. Regulation of testicular function: a spatial and temporal view. *Int Rev Physiol*. 1980;22:41-115.
168. Walsh TJ, Pera RR, Turek PJ. The genetics of male infertility. *Semin Reprod Med*. 2009;27(2):124-36.
169. Gonsalves J, Sun F, Schlegel PN, et al. Defective recombination in infertile men. *Hum Mol Genet*. 2004;13(22):2875-83.
170. Sun F, Mikhaail-Philips M, Oliver-Bonet M, et al. Reduced meiotic recombination on the XY bivalent is correlated with an increased incidence of sex chromosome aneuploidy in men with non-obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod*. 2008;14(7):399-404.
171. Clermont Y. Renewal of spermatogonia in man. *Am J Anat*. 1966;118(2):509-24.
172. Beardsley A, Robertson DM, O'Donnell L. A complex containing alpha6beta1-integrin and phosphorylated focal adhesion kinase between Sertoli cells and elongated spermatids during spermatid release from the seminiferous epithelium. *J Endocrinol*. 2006;190(3):759-70.
173. Matthiesson KL, McLachlan RI, O'Donnell L, et al. The relative roles of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in maintaining spermatogonial maturation and spermiation in normal men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(10):3962-9.
174. Santen RJ, Paulsen CA. Hypogonadotropic eunuchoidism. I. Clinical study of the mode of inheritance. *J Clin Endocrinol Metab*. 1973;36(1):47-54.
175. Kathrins M. Initial investigations into the hormonal basis of spermatogenesis. *Fertil Steril*. 2016;105(1):44.
176. Phillip M, Arbelle JE, Segev Y, et al. Male hypogonadism due to a mutation in the gene for the beta-subunit of follicle-stimulating hormone. *N Engl J Med*. 1998;338(24):1729-32.

177. Saito K, O'Donnell L, McLachlan RI, et al. Spermiation failure is a major contributor to early spermatogenic suppression caused by hormone withdrawal in adult rats. *Endocrinology*. 2000;141(8):2779-85.
178. Sar M, Lubahn DB, French FS, et al. Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology*. 1990;127(6):3180-6.
179. McLachlan RI. The endocrine control of spermatogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2000;14(3):345-62.
180. McLachlan RI, Wreford NG, O'Donnell L, et al. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *J Endocrinol*. 1996;148(1):1-9.
181. Hikim AP, Wang C, Leung A, et al. Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology*. 1995;136(6):2770-5.
182. Sinha-Hikim AP, Swerdloff RS. Temporal and stage-specific changes in spermatogenesis of rat after gonadotropin deprivation by a potent gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology*. 1993;133(5):2161-70.
183. Russell LD, Corbin TJ, Borg KE, et al. Recombinant human follicle-stimulating hormone is capable of exerting a biological effect in the adult hypophysectomized rat by reducing the numbers of degenerating germ cells. *Endocrinology*. 1993;133(5):2062-70.
184. McLachlan RI, O'Donnell L, Stanton PG, et al. Effects of testosterone plus medroxyprogesterone acetate on semen quality, reproductive hormones, and germ cell populations in normal young men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(2):546-56.
185. Rossi P, Dolci S. Paracrine mechanisms involved in the control of early stages of Mammalian spermatogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:181.
186. Huleihel M, Lunenfeld E. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian J Androl*. 2004;6(3):259-68.
187. Skandhan KP, Rajahariprasad A. The process of spermatogenesis liberates significant heat and the scrotum has a role in body thermoregulation. *Med Hypotheses*. 2007;68(2):303-7.
188. Heller CG, Clermont Y. Spermatogenesis in man: an estimate of its duration. *Science*. 1963;140(3563):184-6.

189. Johnson L, Petty CS, Neaves WB. Further quantification of human spermatogenesis: germ cell loss during postprophase of meiosis and its relationship to daily sperm production. *Biol Reprod.* 1983;29(1):207-15.
190. O'Donnell L. Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. *Spermatogenesis.* 2014;4(2):e979623.
191. Turek PJ, Pera RA. Current and future genetic screening for male infertility. *Urol Clin North Am.* 2002;29(4):767-92.
192. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet.* 1976;34(2):119-24.
193. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet.* 1996;5(7):933-43.
194. Reijo R, Alagappan RK, Patrizio P, et al. Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet.* 1996;347(9011):1290-3.
195. Kostiner DR, Turek PJ, Reijo RA. Male infertility: analysis of the markers and genes on the human Y chromosome. *Hum Reprod.* 1998;13(11):3032-8.
196. Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, et al. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Hum Reprod.* 2003;18(8):1660-5.
197. Goncalves C, Cunha M, Rocha E, et al. Y-chromosome microdeletions in nonobstructive azoospermia and severe oligozoospermia. *Asian J Androl.* 2017;19(3):338-45.
198. Park SH, Lee HS, Choe JH, et al. Success rate of microsurgical multiple testicular sperm extraction and sperm presence in the ejaculate in Korean men with Y chromosome microdeletions. *Korean J Urol.* 2013;54(8):536-40.
199. Colaco S, Modi D. Consequences of Y chromosome microdeletions beyond male infertility. *J Assist Reprod Genet.* 2019;36(7):1329-37.
200. Li Q, Song NH, Cao WZ, et al. Relationship between AZFc deletions and testicular histology in infertile South Chinese men with azoospermia and severe oligospermia. *Springerplus.* 2016;5(1):1805.
201. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Prognostic value of Y deletion analysis. The role of current methods. *Hum Reprod.* 2001;16(8):1543-7.

202. Wang PJ, McCarrey JR, Yang F, et al. An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat Genet.* 2001;27(4):422-6.
203. Mueller JL, Skaletsky H, Brown LG, et al. Independent specialization of the human and mouse X chromosomes for the male germ line. *Nat Genet.* 2013;45(9):1083-7.
204. Olesen C, Silber J, Eiberg H, et al. Mutational analysis of the human FATE gene in 144 infertile men. *Hum Genet.* 2003;113(3):195-201.
205. Raverot G, Lejeune H, Kotlar T, et al. X-linked sex-determining region Y box 3 (SOX3) gene mutations are uncommon in men with idiopathic oligozoospermic infertility. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(8):4146-8.
206. Wyrobek AJ, Aardema M, Eichenlaub-Ritter U, et al. Mechanisms and targets involved in maternal and paternal age effects on numerical aneuploidy. *Environ Mol Mutagen.* 1996;28(3):254-64.
207. Martin RH, Rademaker AW. The effect of age on the frequency of sperm chromosomal abnormalities in normal men. *Am J Hum Genet.* 1987;41(3):484-92.
208. Friedman JM. Genetic disease in the offspring of older fathers. *Obstet Gynecol.* 1981;57(6):745-9.
209. Jenkins TG, Aston KI, Trost C, et al. Intra-sample heterogeneity of sperm DNA methylation. *Mol Hum Reprod.* 2015;21(4):313-9.
210. Yatsenko AN, Turek PJ. Reproductive genetics and the aging male. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35(6):933-41.
211. WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple: Cambridge University Press; 2000.
212. Katib AA, Al-Hawsawi K, Motair W, et al. Secondary infertility and the aging male, overview. *Cent European J Urol.* 2014;67(2):184-8.
213. Greenhall E, Vessey M. The prevalence of subfertility: a review of the current confusion and a report of two new studies. *Fertil Steril.* 1990;54(6):978-83.
214. Dimitriadis F, Adonakis G, Kaponis A, et al. Pre-Testicular, Testicular, and Post-Testicular Causes of Male Infertility. In: Simoni M, Huhtaniemi I, editors. *Endocrinology of the Testis and Male Reproduction.* Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 1-47.
215. Agarwal A, Parekh N, Panner Selvam MK, et al. Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for Management of Idiopathic Male Infertility. *World J Mens Health.* 2019;37(3):296-312.

216. Brandt JS, Cruz Ithier MA, Rosen T, et al. Advanced paternal age, infertility, and reproductive risks: A review of the literature. *Prenat Diagn.* 2019;39(2):81-7.
217. Avellino G, Theva D, Oates RD. Common urologic diseases in older men and their treatment: how they impact fertility. *Fertil Steril.* 2017;107(2):305-11.
218. Jennings MO, Owen RC, Keefe D, et al. Management and counseling of the male with advanced paternal age. *Fertil Steril.* 2017;107(2):324-8.
219. Ramasamy R, Chiba K, Butler P, et al. Male biological clock: a critical analysis of advanced paternal age. *Fertil Steril.* 2015;103(6):1402-6.
220. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update.* 2010;16(3):231-45.
221. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S. *Andrology : male reproductive health and dysfunction.* Heidelberg: Springer; 2010.
222. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed 2010.
223. Grimes DA, Lopez LM. "Oligozoospermia," "azoospermia," and other semen-analysis terminology: the need for better science. *Fertil Steril.* 2007;88(6):1491-4.
224. Salonia A, Bettocchi C, Carvalho J, et al. EAU Guidelines on Sexual and Reproductive Health 2020. European Association of Urology Guidelines 2020 Edition. presented at the EAU Annual Congress Amsterdam 2020. Arnhem, The Netherlands: European Association of Urology Guidelines Office; 2020.
225. Martin-du-Pan RC, Bischof P. Increased follicle stimulating hormone in infertile men. Is increased plasma FSH always due to damaged germinal epithelium? *Hum Reprod.* 1995;10(8):1940-5.
226. Simon L, Emery B, Carrell DT. Sperm DNA Fragmentation: Consequences for Reproduction. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1166:87-105.
227. Nicopoullos J, Vicens-Morton A, Lewis SEM, et al. Novel use of COMET parameters of sperm DNA damage may increase its utility to diagnose male infertility and predict live births following both IVF and ICSI. *Hum Reprod.* 2019;34(10):1915-23.
228. Tan J, Taskin O, Albert A, et al. Association between sperm DNA fragmentation and idiopathic recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2019;38(6):951-60.

229. Esteves SC, Roque M, Bradley CK, et al. Reproductive outcomes of testicular versus ejaculated sperm for intracytoplasmic sperm injection among men with high levels of DNA fragmentation in semen: systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2017;108(3):456-67 e1.
230. Carrell DT. The clinical implementation of sperm chromosome aneuploidy testing: pitfalls and promises. *J Androl*. 2008;29(2):124-33.
231. Aran B, Blanco J, Vidal F, et al. Screening for abnormalities of chromosomes X, Y, and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program. *Fertil Steril*. 1999;72(4):696-701.
232. Kohn TP, Kohn JR, Darilek S, et al. Genetic counseling for men with recurrent pregnancy loss or recurrent implantation failure due to abnormal sperm chromosomal aneuploidy. *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(5):571-6.
233. Vincent MC, Daudin M, De MP, et al. Cytogenetic investigations of infertile men with low sperm counts: a 25-year experience. *J Androl*. 2002;23(1):18-22; discussion 44-5.
234. Davila Garza SA, Patrizio P. Reproductive outcomes in patients with male infertility because of Klinefelter's syndrome, Kartagener's syndrome, round-head sperm, dysplasia fibrous sheath, and 'stump' tail sperm: an updated literature review. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2013;25(3):229-46.
235. Bonomi M, Rochira V, Pasquali D, et al. Klinefelter syndrome (KS): genetics, clinical phenotype and hypogonadism. *J Endocrinol Invest*. 2017;40(2):123-34.
236. Wang C, Baker HW, Burger HG, et al. Hormonal studies in Klinefelter's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1975;4(4):399-411.
237. Calogero AE, Giagulli VA, Mongioi LM, et al. Klinefelter syndrome: cardiovascular abnormalities and metabolic disorders. *J Endocrinol Invest*. 2017;40(7):705-12.
238. Aksglaede L, Juul A. Testicular function and fertility in men with Klinefelter syndrome: a review. *Eur J Endocrinol*. 2013;168(4):R67-76.
239. Corona G, Pizzocaro A, Lanfranco F, et al. Sperm recovery and ICSI outcomes in Klinefelter syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2017;23(3):265-75.
240. Nguyen MH, Morel F, Pennamen P, et al. Balanced complex chromosome rearrangement in male infertility: case report and literature review. *Andrologia*. 2015;47(2):178-85.

241. Siffroi JP, Benzacken B, Straub B, et al. Assisted reproductive technology and complex chromosomal rearrangements: the limits of ICSI. *Mol Hum Reprod.* 1997;3(10):847-51.
242. De Boeck K. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatr.* 2020;109(5):893-9.
243. Practice Committee of the American Society for Reproductive M. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2015;103(3):e18-25.
244. Oates R. Evaluation of the azoospermic male. *Asian J Androl.* 2012;14(1):82-7.
245. Tyler-Smith C, Krausz C. The will-o'-the-wisp of genetics--hunting for the azoospermia factor gene. *N Engl J Med.* 2009;360(9):925-7.
246. Krausz C, Forti G, McElreavey K. The Y chromosome and male fertility and infertility. *Int J Androl.* 2003;26(2):70-5.
247. Hinch AG, Altemose N, Noor N, et al. Recombination in the human Pseudoautosomal region PAR1. *PLoS Genet.* 2014;10(7):e1004503.
248. Colaco S, Modi D. Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018;16(1):14.
249. Abur U, Gunes S, Asci R, et al. Chromosomal and Y-chromosome microdeletion analysis in 1,300 infertile males and the fertility outcome of patients with AZFc microdeletions. *Andrologia.* 2019;51(11):e13402.
250. Krausz C, Degl'Innocenti S. Y chromosome and male infertility: update, 2006. *Front Biosci.* 2006;11:3049-61.
251. Kohn TP, Kohn JR, Owen RC, et al. The Prevalence of Y-chromosome Microdeletions in Oligozoospermic Men: A Systematic Review and Meta-analysis of European and North American Studies. *Eur Urol.* 2019;76(5):626-36.
252. Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, et al. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology.* 2014;2(1):5-19.
253. McQuaid JW, Tanrikut C. Ejaculatory duct obstruction: current diagnosis and treatment. *Curr Urol Rep.* 2013;14(4):291-7.
254. Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. An update on the clinical assessment of the infertile male. [corrected]. *Clinics (Sao Paulo).* 2011;66(4):691-700.
255. Aziz N. The importance of semen analysis in the context of azoospermia. *Clinics (Sao Paulo).* 2013;68 Suppl 1:35-8.



256. Schlegel PN. Causes of azoospermia and their management. *Reprod Fertil Dev.* 2004;16(5):561-72.
257. Wosnitzer MS, Goldstein M. Obstructive azoospermia. *Urol Clin North Am.* 2014;41(1):83-95.
258. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine in collaboration with the Society for Male R, Urology. Electronic address aao. The management of obstructive azoospermia: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2019;111(5):873-80.
259. Esteves SC, Agarwal A. Reproductive outcomes, including neonatal data, following sperm injection in men with obstructive and nonobstructive azoospermia: case series and systematic review. *Clinics (Sao Paulo).* 2013;68 Suppl 1:141-50.
260. Karabulut S, Keskin I, Kutlu P, et al. Male infertility, azoospermia and cryptozoospermia incidence among three infertility clinics in Turkey. *Turk J Urol.* 2018;44(2):109-13.
261. Modgil V, Rai S, Ralph DJ, et al. An update on the diagnosis and management of ejaculatory duct obstruction. *Nat Rev Urol.* 2016;13(1):13-20.
262. Hargreave TB. *Male infertility.* London: Springer; 1997.
263. Hendry WF, Parslow JM, Stedronska J. Exploratory scrototomy in 168 azoospermic males. *Br J Urol.* 1983;55(6):785-91.
264. Jequier AM. Obstructive azoospermia: a study of 102 patients. *Clin Reprod Fertil.* 1985;3(1):21-36.
265. Oates RD, Amos JA. The genetic basis of congenital bilateral absence of the vas deferens and cystic fibrosis. *J Androl.* 1994;15(1):1-8.
266. Handelsman DJ, Conway AJ, Boylan LM, et al. Young's syndrome. Obstructive azoospermia and chronic sinopulmonary infections. *N Engl J Med.* 1984;310(1):3-9.
267. Schoysman R. Vaso-epididymostomy--a survey of techniques and results with considerations of delay of appearance of spermatozoa after surgery. *Acta Eur Fertil.* 1990;21(5):239-45.
268. Silber SJ, Grotjan HE. Microscopic vasectomy reversal 30 years later: a summary of 4010 cases by the same surgeon. *J Androl.* 2004;25(6):845-59.
269. Jarvi K, Zini A, Buckspan MB, et al. Adverse effects on vasoepididymostomy outcomes for men with concomitant abnormalities in the prostate and seminal vesicle. *J Urol.* 1998;160(4):1410-2.

270. Matthews GJ, Schlegel PN, Goldstein M. Patency following microsurgical vasoepididymostomy and vasovasostomy: temporal considerations. *J Urol.* 1995;154(6):2070-3.
271. Wosnitzer M, Goldstein M, Hardy MP. Review of Azoospermia. *Spermatogenesis.* 2014;4:e28218.
272. Goldstein M. *Surgery of male infertility.* Philadelphia: W.B. Saunders; 1995.
273. Shin D, Lipshultz LI, Goldstein M, et al. Herniorrhaphy with polypropylene mesh causing inguinal vasal obstruction: a preventable cause of obstructive azoospermia. *Ann Surg.* 2005;241(4):553-8.
274. de Souza DAS, Faucz FR, Pereira-Ferrari L, et al. Congenital bilateral absence of the vas deferens as an atypical form of cystic fibrosis: reproductive implications and genetic counseling. *Andrology.* 2018;6(1):127-35.
275. Avellino GJ, Lipshultz LI, Sigman M, et al. Transurethral resection of the ejaculatory ducts: etiology of obstruction and surgical treatment options. *Fertil Steril.* 2019;111(3):427-43.
276. Schroeder-Printzen I, Ludwig M, Kohn F, et al. Surgical therapy in infertile men with ejaculatory duct obstruction: technique and outcome of a standardized surgical approach. *Hum Reprod.* 2000;15(6):1364-8.
277. Engin G, Kadioglu A, Orhan I, et al. Transrectal US and endorectal MR imaging in partial and complete obstruction of the seminal duct system. A comparative study. *Acta Radiol.* 2000;41(3):288-95.
278. Kuligowska E, Baker CE, Oates RD. Male infertility: role of transrectal US in diagnosis and management. *Radiology.* 1992;185(2):353-60.
279. Colpi GM, Casella F, Zanollo A, et al. Functional voiding disturbances of the ampullo-vesicular seminal tract: a cause of male infertility. *Acta Eur Fertil.* 1987;18(3):165-79.
280. Font MD, Pastuszak AW, Case JR, et al. An infertile male with dilated seminal vesicles due to functional obstruction. *Asian J Androl.* 2017;19(2):256-7.
281. Belker AM, Thomas AJ, Jr., Fuchs EF, et al. Results of 1,469 microsurgical vasectomy reversals by the Vasovasostomy Study Group. *J Urol.* 1991;145(3):505-11.
282. Jee SH, Hong YK. One-layer vasovasostomy: microsurgical versus loupe-assisted. *Fertil Steril.* 2010;94(6):2308-11.

283. Farber NJ, Flannigan R, Li P, et al. The Kinetics of Sperm Return and Late Failure Following Vasovasostomy or Vasoepididymostomy: A Systematic Review. *J Urol*. 2019;201(2):241-50.
284. Johnson CW, Bingham JB, Goluboff ET, et al. Transurethral resection of the ejaculatory ducts for treating ejaculatory symptoms. *BJU Int*. 2005;95(1):117-9.
285. Kasman AM, Li S, Luke B, et al. Male Infertility and Future Cardiometabolic Health: Does the Association Vary by Sociodemographic Factors? *Urology*. 2019;133:121-8.
286. Ozturk H, Saracoglu M, Zengin T, et al. Asymptomatic Sertoli cell tumour diagnosed during azoospermia work-up. *Asian J Androl*. 2013;15(6):845-6.
287. Fallick ML, Lin WW, Lipshultz LI. Leydig cell tumors presenting as azoospermia. *J Urol*. 1999;161(5):1571-2.
288. Dieckmann KP, Pichlmeier U. Clinical epidemiology of testicular germ cell tumors. *World J Urol*. 2004;22(1):2-14.
289. Eisenberg ML, Betts P, Herder D, et al. Increased risk of cancer among azoospermic men. *Fertil Steril*. 2013;100(3):681-5.
290. Salonia A, Matloob R, Gallina A, et al. Are infertile men less healthy than fertile men? Results of a prospective case-control survey. *Eur Urol*. 2009;56(6):1025-31.
291. Ventimiglia E, Capogrosso P, Boeri L, et al. Infertility as a proxy of general male health: results of a cross-sectional survey. *Fertil Steril*. 2015;104(1):48-55.
292. Guo D, Li S, Behr B, et al. Hypertension and Male Fertility. *World J Mens Health*. 2017;35(2):59-64.
293. Bobjer J, Naumovska M, Giwercman YL, et al. High prevalence of androgen deficiency and abnormal lipid profile in infertile men with non-obstructive azoospermia. *Int J Androl*. 2012;35(5):688-94.
294. Patel DP, Brant WO, Myers JB, et al. Sperm concentration is poorly associated with hypoandrogenism in infertile men. *Urology*. 2015;85(5):1062-7.
295. Capogrosso P, Pozzi EP, Celentano V, et al. Erectile Recovery After Radical Pelvic Surgery: Methodological Challenges and Recommendations for Data Reporting. *J Sex Med*. 2020;17(1):7-16.
296. Ventimiglia E, Ippolito S, Capogrosso P, et al. Primary, secondary and compensated hypogonadism: a novel risk stratification for infertile men. *Andrology*. 2017;5(3):505-10.

297. Clementini E, Palka C, Iezzi I, et al. Prevalence of chromosomal abnormalities in 2078 infertile couples referred for assisted reproductive techniques. *Hum Reprod.* 2005;20(2):437-42.
298. Jensen CFS, Fode M, Ostergren PB, et al. A Refined View on the Association Between Y-chromosome Microdeletions and Sperm Concentration. *Eur Urol.* 2019;76(5):637-8.
299. Chillon M, Casals T, Mercier B, et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med.* 1995;332(22):1475-80.
300. De Braekeleer M, Ferec C. Mutations in the cystic fibrosis gene in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Mol Hum Reprod.* 1996;2(9):669-77.
301. Colpi GM, Piediferro G, Nerva F, et al. Sperm retrieval for intra-cytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Minerva Urol Nefrol.* 2005;57(2):99-107.
302. Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. Sperm retrieval techniques for assisted reproduction. *Int Braz J Urol.* 2011;37(5):570-83.
303. Devroey P, Liu J, Nagy Z, et al. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1994;62(3):639-41.
304. Tournaye H, Verheyen G, Nagy P, et al. Are there any predictive factors for successful testicular sperm recovery in azoospermic patients? *Hum Reprod.* 1997;12(1):80-6.
305. Schlegel PN. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod.* 1999;14(1):131-5.
306. Okada H, Dobashi M, Yamazaki T, et al. Conventional versus microdissection testicular sperm extraction for nonobstructive azoospermia. *J Urol.* 2002;168(3):1063-7.
307. Skakkebaek NE. Possible carcinoma-in-situ of the testis. *Lancet.* 1972;2(7776):516-7.
308. Moller H, Skakkebaek NE. Risk of testicular cancer in subfertile men: case-control study. *BMJ.* 1999;318(7183):559-62.
309. Giwercman A, Bruun E, Frimodt-Moller C, et al. Prevalence of carcinoma in situ and other histopathological abnormalities in testes of men with a history of cryptorchidism. *J Urol.* 1989;142(4):998-1001: discussion -2.

310. Dieckmann KP, Loy V. Prevalence of contralateral testicular intraepithelial neoplasia in patients with testicular germ cell neoplasms. *J Clin Oncol.* 1996;14(12):3126-32.
311. Elzinga-Tinke JE, Sirre ME, Looijenga LH, et al. The predictive value of testicular ultrasound abnormalities for carcinoma in situ of the testis in men at risk for testicular cancer. *Int J Androl.* 2010;33(4):597-603.
312. Hauser R, Yogev L, Paz G, et al. Comparison of efficacy of two techniques for testicular sperm retrieval in nonobstructive azoospermia: multifocal testicular sperm extraction versus multifocal testicular sperm aspiration. *J Androl.* 2006;27(1):28-33.
313. Schulze W, Thoms F, Knuth UA. Testicular sperm extraction: comprehensive analysis with simultaneously performed histology in 1418 biopsies from 766 subfertile men. *Hum Reprod.* 1999;14 Suppl 1:82-96.
314. Ramasamy R, Schlegel PN. Microdissection testicular sperm extraction: effect of prior biopsy on success of sperm retrieval. *J Urol.* 2007;177(4):1447-9.
315. Tsujimura A, Matsumiya K, Miyagawa Y, et al. Conventional multiple or microdissection testicular sperm extraction: a comparative study. *Hum Reprod.* 2002;17(11):2924-9.
316. Lee PA. Fertility after cryptorchidism: epidemiology and other outcome studies. *Urology.* 2005;66(2):427-31.
317. Cortes D, Thorup JM, Visfeldt J. Cryptorchidism: aspects of fertility and neoplasms. A study including data of 1,335 consecutive boys who underwent testicular biopsy simultaneously with surgery for cryptorchidism. *Horm Res.* 2001;55(1):21-7.
318. Herrinton LJ, Zhao W, Husson G. Management of cryptorchism and risk of testicular cancer. *Am J Epidemiol.* 2003;157(7):602-5.
319. Pettersson A, Richiardi L, Nordenskjold A, et al. Age at surgery for undescended testis and risk of testicular cancer. *N Engl J Med.* 2007;356(18):1835-41.
320. Hadziselimovic F, Hoecht B. Testicular histology related to fertility outcome and postpubertal hormone status in cryptorchidism. *Klin Padiatr.* 2008;220(5):302-7.
321. del Vecchio MT, Epistolato MC, Tripodi SA, et al. Intratubular germ cell neoplasia of unclassified type. *Anal Quant Cytol Histol.* 2006;28(3):157-70.
322. Hadziselimovic F, Herzog B. Treatment with a luteinizing hormone-releasing hormone analogue after successful orchiopexy markedly improves the chance of fertility later in life. *J Urol.* 1997;158(3 Pt 2):1193-5.

323. Eifler JB, Jr., King P, Schlegel PN. Incidental testicular lesions found during infertility evaluation are usually benign and may be managed conservatively. *J Urol*. 2008;180(1):261-4; discussion 5.
324. Carmignani L, Gadda F, Mancini M, et al. Detection of testicular ultrasonographic lesions in severe male infertility. *J Urol*. 2004;172(3):1045-7.
325. Connolly SS, D'Arcy FT, Gough N, et al. Carefully selected intratesticular lesions can be safely managed with serial ultrasonography. *BJU Int*. 2006;98(5):1005-7; discussion 7.
326. Sheynkin YR, Sukkarieh T, Lipke M, et al. Management of nonpalpable testicular tumors. *Urology*. 2004;63(6):1163-7; discussion 7.
327. Toren PJ, Roberts M, Lecker I, et al. Small incidentally discovered testicular masses in infertile men--is active surveillance the new standard of care? *J Urol*. 2010;183(4):1373-7.
328. Gori S, Porrozzì S, Roila F, et al. Germ cell tumours of the testis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005;53(2):141-64.
329. Huyghe E, Matsuda T, Thonneau P. Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *J Urol*. 2003;170(1):5-11.
330. Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Giwercman A, et al. Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int J Androl*. 1987;10(1):19-28.
331. Giwercman A, Skakkebaek NE. Carcinoma in situ of the testis: biology, screening and management. *Eur Urol*. 1993;23 Suppl 2:19-21.
332. Kliesch S, Thomaidis T, Schutte B, et al. Update on the diagnostic safety for detection of testicular intraepithelial neoplasia (TIN). *APMIS*. 2003;111(1):70-4; discussion 5.
333. Schmoll HJ, Souchon R, Krege S, et al. European consensus on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the European Germ Cell Cancer Consensus Group (EGCCCG). *Ann Oncol*. 2004;15(9):1377-99.
334. Heidenreich A. Contralateral testicular biopsy in testis cancer: current concepts and controversies. *BJU Int*. 2009;104(9 Pt B):1346-50.
335. van Casteren NJ, Stoop H, Dohle GR, et al. Noninvasive detection of testicular carcinoma in situ in semen using OCT3/4. *Eur Urol*. 2008;54(1):153-8.

336. van Casteren NJ, Looijenga LH, Dohle GR. Testicular microlithiasis and carcinoma in situ overview and proposed clinical guideline. *Int J Androl.* 2009;32(4):279-87.
337. Oosterhuis JW, Stoop H, Dohle G, et al. A pathologist's view on the testis biopsy. *Int J Androl.* 2011;34(4 Pt 2):e14-9; discussion e20.
338. Hanevik HI, Isfoss BL, Bergh A, et al. Improved diagnostic accuracy of testicular biopsies for infertility through simplified criteria and a dedicated pathologist. *Anal Quant Cytol Histol.* 2010;32(4):214-8.
339. Cooperberg MR, Chi T, Jad A, et al. Variability in testis biopsy interpretation: implications for male infertility care in the era of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2005;84(3):672-7.
340. Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, et al. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol Pathol.* 2002;30(4):524-33.
341. van Casteren NJ, de Jong J, Stoop H, et al. Evaluation of testicular biopsies for carcinoma in situ: immunohistochemistry is mandatory. *Int J Androl.* 2009;32(6):666-74.
342. Honecker F, Stoop H, de Krijger RR, et al. Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by fetal germ cells. *J Pathol.* 2004;203(3):849-57.
343. 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(1):2-25.
344. Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003;1:107.
345. Silber SJ, Nagy Z, Devroey P, et al. Distribution of spermatogenesis in the testicles of azoospermic men: the presence or absence of spermatids in the testes of men with germinal failure. *Hum Reprod.* 1997;12(11):2422-8.
346. Nistal M, Paniagua R. Testicular biopsy. Contemporary interpretation. *Urol Clin North Am.* 1999;26(3):555-93, vi.
347. Joshi KR, Ramdeo IN, Sachdev KN, et al. Effects of vasectomy on testes. *Int Surg.* 1972;57(9):711-3.
348. Jamal AA, Mansoor I. Morphological profile of testicular biopsies associated with infertility. *Saudi Med J.* 2001;22(11):992-4.

349. Gunnell DJ, Ewings P. Infertility prevalence, needs assessment and purchasing. *J Public Health Med.* 1994;16(1):29-35.
350. Philippov OS, Radionchenko AA, Bolotova VP, et al. Estimation of the prevalence and causes of infertility in western Siberia. *Bull World Health Organ.* 1998;76(2):183-7.
351. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod.* 1991;6(6):811-6.
352. Willott GM. Frequency of azoospermia. *Forensic Sci Int.* 1982;20(1):9-10.
353. Esteves SC. Novel concepts in male factor infertility: clinical and laboratory perspectives. *J Assist Reprod Genet.* 2016;33(10):1319-35.
354. Esteves SC, Roque M, Bedoschi G, et al. Intracytoplasmic sperm injection for male infertility and consequences for offspring. *Nat Rev Urol.* 2018;15(9):535-62.
355. Silber SJ, Nagy ZP, Liu J, et al. Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum Reprod.* 1994;9(9):1705-9.
356. Gil-Salom M, Romero J, Rubio C, et al. Intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;169(1-2):15-9.
357. Schroeder-Printzen I, Zumbe J, Bispink L, et al. Microsurgical epididymal sperm aspiration: aspirate analysis and straws available after cryopreservation in patients with non-reconstructable obstructive azoospermia. MESA/TESE Group Giessen. *Hum Reprod.* 2000;15(12):2531-5.
358. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society for Male R, Urology. The management of infertility due to obstructive azoospermia. *Fertil Steril.* 2008;90(5 Suppl):S121-4.
359. Vernaev V, Bonduelle M, Tournaye H, et al. Pregnancy outcome and neonatal data of children born after ICSI using testicular sperm in obstructive and non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 2003;18(10):2093-7.
360. Donoso P, Tournaye H, Devroey P. Which is the best sperm retrieval technique for non-obstructive azoospermia? A systematic review. *Hum Reprod Update.* 2007;13(6):539-49.



361. Bernie AM, Mata DA, Ramasamy R, et al. Comparison of microdissection testicular sperm extraction, conventional testicular sperm extraction, and testicular sperm aspiration for nonobstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2015;104(5):1099-103 e1-3.
362. Ramasamy R, Padilla WO, Osterberg EC, et al. A comparison of models for predicting sperm retrieval before microdissection testicular sperm extraction in men with nonobstructive azoospermia. *J Urol*. 2013;189(2):638-42.
363. Verheyen G, Joris H, Crits K, et al. Comparison of different hypo-osmotic swelling solutions to select viable immotile spermatozoa for potential use in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod Update*. 1997;3(3):195-203.
364. Tournaye H, Liu J, Nagy Z, et al. The use of testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection in patients with necrozoospermia. *Fertil Steril*. 1996;66(2):331-4.
365. Esteves SC, Miyaoka R, Orosz JE, et al. An update on sperm retrieval techniques for azoospermic males. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013;68 Suppl 1:99-110.
366. Jenkins LC, Mulhall JP. Delayed orgasm and anorgasmia. *Fertil Steril*. 2015;104(5):1082-8.
367. Jefferys A, Siassakos D, Wardle P. The management of retrograde ejaculation: a systematic review and update. *Fertil Steril*. 2012;97(2):306-12.
368. Agarwal A, Majzoub A, Esteves SC, et al. Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. *Transl Androl Urol*. 2016;5(6):935-50.
369. Aitken RJ. DNA damage in human spermatozoa; important contributor to mutagenesis in the offspring. *Transl Androl Urol*. 2017;6(Suppl 4):S761-S4.
370. Rima D, Shiv BK, Bhavna C, et al. Oxidative Stress Induced Damage to Paternal Genome and Impact of Meditation and Yoga - Can it Reduce Incidence of Childhood Cancer? *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(9):4517-25.
371. Santi D, Spaggiari G, Simoni M. Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management - meta-analyses. *Reprod Biomed Online*. 2018;37(3):315-26.
372. Esteves SC, Agarwal A, Cho CL, et al. A Strengths-Weaknesses-Opportunities-Threats (SWOT) analysis on the clinical utility of sperm DNA fragmentation testing in specific male infertility scenarios. *Transl Androl Urol*. 2017;6(Suppl 4):S734-S60.

373. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril*. 2010;93(4):1027-36.
374. Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, et al. Investigation on the Origin of Sperm DNA Fragmentation: Role of Apoptosis, Immaturity and Oxidative Stress. *Mol Med*. 2015;21:109-22.
375. Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod*. 2005;20(1):226-30.
376. Moskovtsev SI, Jarvi K, Mullen JB, et al. Testicular spermatozoa have statistically significantly lower DNA damage compared with ejaculated spermatozoa in patients with unsuccessful oral antioxidant treatment. *Fertil Steril*. 2010;93(4):1142-6.
377. Mehta A, Bolyakov A, Schlegel PN, et al. Higher pregnancy rates using testicular sperm in men with severe oligospermia. *Fertil Steril*. 2015;104(6):1382-7.
378. Arafa M, AlMalki A, AlBadr M, et al. ICSI outcome in patients with high DNA fragmentation: Testicular versus ejaculated spermatozoa. *Andrologia*. 2018;50(1).
379. Zhang J, Xue H, Qiu F, et al. Testicular spermatozoon is superior to ejaculated spermatozoon for intracytoplasmic sperm injection to achieve pregnancy in infertile males with high sperm DNA damage. *Andrologia*. 2019;51(2):e13175.
380. Herrero MB, Lusignan MF, Son WY, et al. ICSI outcomes using testicular spermatozoa in non-azoospermic couples with recurrent ICSI failure and no previous live births. *Andrology*. 2019;7(3):281-7.
381. Esteves SC, Roque M, Garrido N. Use of testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with high sperm DNA fragmentation: a SWOT analysis. *Asian J Androl*. 2018;20(1):1-8.
382. Weissman A, Horowitz E, Ravhon A, et al. Pregnancies and live births following ICSI with testicular spermatozoa after repeated implantation failure using ejaculated spermatozoa. *Reprod Biomed Online*. 2008;17(5):605-9.
383. Bendikson KA, Neri QV, Takeuchi T, et al. The outcome of intracytoplasmic sperm injection using occasional spermatozoa in the ejaculate of men with spermatogenic failure. *J Urol*. 2008;180(3):1060-4.
384. Hauser R, Bibi G, Yogev L, et al. Virtual azoospermia and cryptozoospermia--fresh/frozen testicular or ejaculate sperm for better IVF outcome? *J Androl*. 2011;32(5):484-90.

385. Amirjannati N, Heidari-Vala H, Akhondi MA, et al. Comparison of intracytoplasmic sperm injection outcomes between spermatozoa retrieved from testicular biopsy and from ejaculation in cryptozoospermic men. *Andrologia*. 2012;44 Suppl 1:704-9.
386. Ben-Ami I, Raziell A, Strassburger D, et al. Intracytoplasmic sperm injection outcome of ejaculated versus extracted testicular spermatozoa in cryptozoospermic men. *Fertil Steril*. 2013;99(7):1867-71.
387. Ketabchi AA. Intracytoplasmic Sperm Injection Outcomes with Freshly Ejaculated Sperms and Testicular or Epididymal Sperm Extraction in Patients with Idiopathic Cryptozoospermia. *Nephrourol Mon*. 2016;8(6):e41375.
388. Cui X, Ding P, Gao G, et al. Comparison of the Clinical Outcomes of Intracytoplasmic Sperm Injection Between Spermatozoa Retrieved From Testicular Biopsy and From Ejaculate in Cryptozoospermia Patients. *Urology*. 2017;102:106-10.
389. Kang YN, Hsiao YW, Chen CY, et al. Testicular sperm is superior to ejaculated sperm for ICSI in cryptozoospermia: An update systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2018;8(1):7874.
390. Ku FY, Wu CC, Hsiao YW, et al. Association of sperm source with miscarriage and take-home baby after ICSI in cryptozoospermia: a meta-analysis of testicular and ejaculated sperm. *Andrology*. 2018;6(6):882-9.
391. Yu Y, Wang R, Xi Q, et al. Effect of paternal age on intracytoplasmic sperm injection outcomes in cryptozoospermic men: Ejaculated or testicular sperm? *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(26):e16209.
392. Nagy ZP, Varghese AC, Agarwal A. Practical manual of in vitro fertilization : advanced methods and novel devices. New York: Springer; 2012.
393. Shah R. Surgical sperm retrieval: Techniques and their indications. *Indian J Urol*. 2011;27(1):102-9.
394. Temple-Smith PD, Southwick GJ, Yates CA, et al. Human pregnancy by in vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from the epididymis. *J In Vitro Fert Embryo Transf*. 1985;2(3):119-22.
395. Matthews GJ, Goldstein M. A simplified method of epididymal sperm aspiration. *Urology*. 1996;47(1):123-5.
396. Nudell DM, Conaghan J, Pedersen RA, et al. The mini-micro-epididymal sperm aspiration for sperm retrieval: a study of urological outcomes. *Hum Reprod*. 1998;13(5):1260-5.

397. Van Peperstraten A, Proctor ML, Johnson NP, et al. Techniques for surgical retrieval of sperm prior to ICSI for azoospermia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006(3):CD002807.
398. Shrivastav P, Nadkarni P, Wensvoort S, et al. Percutaneous epididymal sperm aspiration for obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 1994;9(11):2058-61.
399. Levine LA, Dimitriou RJ, Fakouri B. Testicular and epididymal percutaneous sperm aspiration in men with either obstructive or nonobstructive azoospermia. *Urology.* 2003;62(2):328-32.
400. Qiu Y, Yang DT, Wang SM, et al. Successful pregnancy and birth after intrauterine insemination using caput epididymal sperm by percutaneous aspiration. *Asian J Androl.* 2003;5(1):73-5.
401. Tournaye H, Clasen K, Aytöz A, et al. Fine needle aspiration versus open biopsy for testicular sperm recovery: a controlled study in azoospermic patients with normal spermatogenesis. *Hum Reprod.* 1998;13(4):901-4.
402. Turek PJ, Givens CR, Schriock ED, et al. Testis sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection guided by prior fine-needle aspiration mapping in patients with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril.* 1999;71(3):552-7.
403. Lee AP, Roth MY, Nya-Ngatchou JJ, et al. Testicular fine-needle aspiration for the assessment of intratesticular hormone concentrations. *Asian J Androl.* 2016;18(1):21-4.
404. Kaponis A, Yiannakis D, Tsoukanelis K, et al. The role of ultrasonographically guided puncture of the human rete testis in the therapeutic management of nonobstructive azoospermia. *Andrologia.* 2003;35(2):85-92.
405. Devroey P, Liu J, Nagy Z, et al. Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 1995;10(6):1457-60.
406. Schlegel PN. Nonobstructive azoospermia: a revolutionary surgical approach and results. *Semin Reprod Med.* 2009;27(2):165-70.
407. Colpi GM, Colpi EM, Piediferro G, et al. Microsurgical TESE versus conventional TESE for ICSI in non-obstructive azoospermia: a randomized controlled study. *Reprod Biomed Online.* 2009;18(3):315-9.
408. Esteves SC. Clinical management of infertile men with nonobstructive azoospermia. *Asian J Androl.* 2015;17(3):459-70.

409. Van Peperstraten A, Proctor ML, Johnson NP, et al. Techniques for surgical retrieval of sperm prior to intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) for azoospermia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008(2):CD002807.
410. Su LM, Palermo GD, Goldstein M, et al. Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for nonobstructive azoospermia: testicular histology can predict success of sperm retrieval. *J Urol.* 1999;161(1):112-6.
411. Schlegel PN, Su LM. Physiological consequences of testicular sperm extraction. *Hum Reprod.* 1997;12(8):1688-92.
412. Rosenlund B, Westlander G, Wood M, et al. Sperm retrieval and fertilization in repeated percutaneous epididymal sperm aspiration. *Hum Reprod.* 1998;13(10):2805-7.
413. Esteves SC, Lee W, Benjamin DJ, et al. Reproductive potential of men with obstructive azoospermia undergoing percutaneous sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection according to the cause of obstruction. *J Urol.* 2013;189(1):232-7.
414. Ramasamy R, Yagan N, Schlegel PN. Structural and functional changes to the testis after conventional versus microdissection testicular sperm extraction. *Urology.* 2005;65(6):1190-4.
415. Schill T, Bals-Pratsch M, Kupker W, et al. Clinical and endocrine follow-up of patients after testicular sperm extraction. *Fertil Steril.* 2003;79(2):281-6.
416. Turunc T, Gul U, Haydardedeoglu B, et al. Conventional testicular sperm extraction combined with the microdissection technique in nonobstructive azoospermic patients: a prospective comparative study. *Fertil Steril.* 2010;94(6):2157-60.
417. Schiff JD, Palermo GD, Veeck LL, et al. Success of testicular sperm extraction [corrected] and intracytoplasmic sperm injection in men with Klinefelter syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(11):6263-7.
418. Carpi A, Sabanegh E, Mechanick J. Controversies in the management of nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril.* 2009;91(4):963-70.
419. Whalen DH, Cooper AM, Fowler CA. P-center judgments are generally insensitive to the instructions given. *Phonetica.* 1989;46(4):197-203.
420. Kovacic B, Vlaisavljevic V, Reljic M. Clinical use of pentoxifylline for activation of immotile testicular sperm before ICSI in patients with azoospermia. *J Androl.* 2006;27(1):45-52.

421. Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ, Jr., et al. Suitability of the hypo-osmotic swelling test for assessing the viability of cryopreserved sperm. *Fertil Steril.* 1996;66(5):798-804.
422. Verheyen G, De Croo I, Tournaye H, et al. Comparison of four mechanical methods to retrieve spermatozoa from testicular tissue. *Hum Reprod.* 1995;10(11):2956-9.
423. Baukloh V, German Society for Human Reproductive B. Retrospective multicentre study on mechanical and enzymatic preparation of fresh and cryopreserved testicular biopsies. *Hum Reprod.* 2002;17(7):1788-94.
424. Crabbe E, Verheyen G, Silber S, et al. Enzymatic digestion of testicular tissue may rescue the intracytoplasmic sperm injection cycle in some patients with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 1998;13(10):2791-6.
425. Ben Rhouma K, Marrakchi H, Khouja H, et al. Outcome of intracytoplasmic injection of fresh and frozen-thawed testicular spermatozoa. A comparative study. *J Reprod Med.* 2003;48(5):349-54.
426. Verheyen G, Nagy Z, Joris H, et al. Quality of frozen-thawed testicular sperm and its preclinical use for intracytoplasmic sperm injection into in vitro-matured germinal-vesicle stage oocytes. *Fertil Steril.* 1997;67(1):74-80.
427. Verheyen G, Vernaev V, Van Landuyt L, et al. Should diagnostic testicular sperm retrieval followed by cryopreservation for later ICSI be the procedure of choice for all patients with non-obstructive azoospermia? *Hum Reprod.* 2004;19(12):2822-30.
428. Aydos K, Demirel LC, Baltaci V, et al. Enzymatic digestion plus mechanical searching improves testicular sperm retrieval in non-obstructive azoospermia cases. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005;120(1):80-6.

