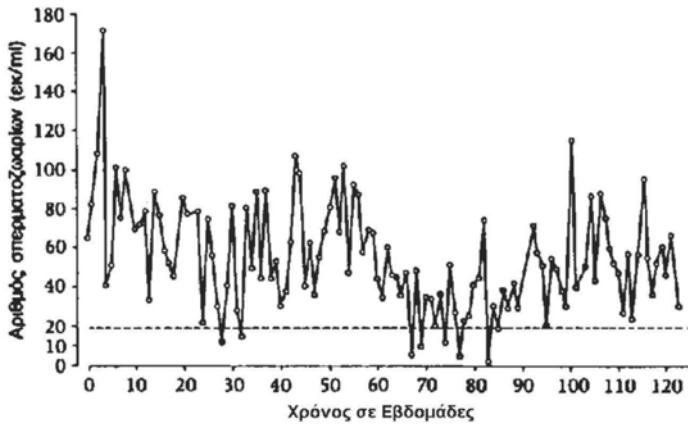


Το ζευγάρι που προσπαθεί να κάνει παιδί θα ξεκινήσει την διερεύνηση με κάποιες εργαστηριακές εξετάσεις. Ο άνδρας θα ελέγξει την γονιμοποιητική ικανότητά του κάνοντας αρχικά σπερμοδιάγραμμα. Το σπερμοδιάγραμμα θα δώσει επίσης χρήσιμες πληροφορίες για την έκβαση της θεραπείας τόσο των όρχεων όσο και των επικουρικών αδένων του άρρενος αναπαραγωγικού. Βέβαια, αν και το σπερμοδιάγραμμα πάντοτε αποτελεί το πρώτο και ιδιαίτερα σημαντικό βήμα στην διερεύνηση του υπογόνιμου άνδρα, μπορεί να μην κριθεί αρκετό στην λήψη κλινικών αποφάσεων. Έτσι, με την καθοδήγηση του γιατρού του, θα προχωρήσει ο ενδιαφερόμενος σε άλλες εργαστηριακές εξετάσεις σπέρματος, όπως οι καλλιέργειες για την ανίχνευση μικροοργανισμών, στο βιοχημικό προσδιορισμό της φρουκτόζης, της όξινης φωσφατάσης ή της α-γλυκοσιδάσης για τη λειτουργία των σπερματοδόχων κύστεων, του προστάτη και της επιδιδυμίδας αντίστοιχα ή θα προχωρήσει σε έλεγχο αντισπερματικών αντισωμάτων του σπερματικού πλάσματος για την πιθανή συνύπαρξη ανοσολογικού παράγοντα. Τα τελευταία χρόνια στη λίστα αυτή των διαγνωστικών εξετάσεων έχουν προστεθεί και οι λειτουργικές δοκιμασίες, που εξετάζουν την ακεραιότητα του DNA ή το σωστό «πακετάρισμά του» στο πυρήνα του σπερματοζωαρίου. Λόγω της χρησιμότητας του λοιπόν, ο τομέας της εργαστηριακής Ανδρολογίας έχει εξελιχθεί τα τελευταία χρόνια σε ένα ταχύτατα αναπτυσσόμενο τομέα.

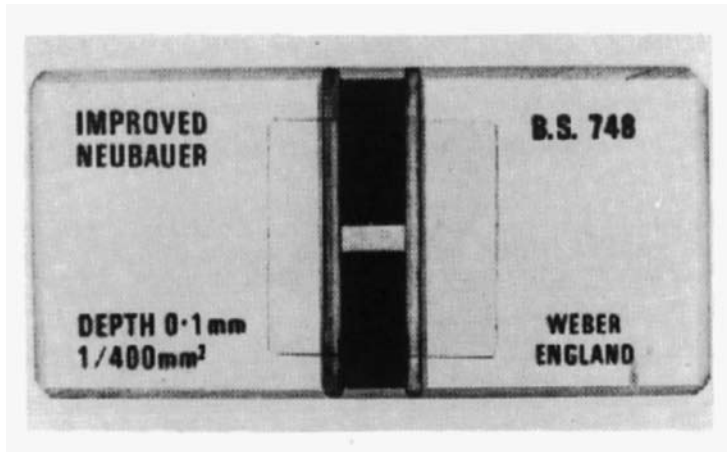
Όπως ήδη αναφέρθηκε, το πρώτο βήμα είναι πάντοτε το σπερμοδιάγραμμα. Πριν από αυτή την εξέταση ο ενδιαφερόμενος χρειάζεται ορισμένες οδηγίες, απαραίτητες για τη σωστή διενέργεια της εξέτασης. Αρχικά λοιπόν πρέπει να τηρηθούν 3-7 μέρες σεξουαλικής αποχής και το δείγμα πρέπει να είναι δείγμα αυνανισμού. Ο εξεταζόμενος μπορεί να ετοιμάσει το δείγμα στο χώρο του, συλλέγοντας όλο τον όγκο της εκσπερμάτισης, και μετά το παραδίδει στο εργαστήριο παίρνοντας ορισμένες προφυλάξεις. Πάντοτε μία προσυνεννόηση με το εργαστήριο είναι χρήσιμη, αν όχι απαραίτητη. Πολλές φορές μία μόνο εξέταση σπέρματος δεν είναι αρκετή. Λόγω της έντονης διακύμανσης που φυσιολογικά παρουσιάζεται στον ίδιο άνδρα από εκσπερμάτιση σε εκσπερμάτιση, είναι απαραίτητο να επαναληφθεί το σπερμοδιάγραμμα για δεύτερη ή τρίτη φορά (σχ 1).



Σχ 1 Διακύμανση του αριθμού των σπερματοζωαρίων στον ίδιο άνδρα σε διαφορετικές μέρες.

Οι παράμετροι που μελετά το σπερμοδιάγραμμα μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: αρχικά γίνεται η μακροσκοπική εξέταση που συμπεριλαμβάνει τον όγκο, τη ρευστοποίηση, τη γλοιότητα και το pH. Ακολουθεί η μικροσκοπική εξέταση, στην οποία μετριέται ο αριθμός των σπερματοζωαρίων, ο αριθμός των στρογγυλών κυττάρων και γίνεται η διαφοροποίηση τους, εκτιμάται η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και η μορφολογία τους. Οι παράμετροι της μικροσκοπικής εξέτασης έχουν όλοι την ίδια κλινική σημασία. Τόσο οι παράμετροι της μακροσκοπικής όσο και οι παράμετροι της μικροσκοπικής εξέτασης μπορούν να μετρηθούν με πολλούς τρόπους. Ας δούμε τις παραμέτρους της μακροσκοπικής εξέτασης με περισσότερες λεπτομέρειες:

- ο αριθμός των σπερματοζωαρίων μπορεί να μετρηθεί με τον θάλαμο Newbauer, το Makler, το Microcell κ.α. (σχ 2) Οι διαφορετικοί αυτοί θάλαμοι δεν έχουν την ίδια ακρίβεια, αυτό σημαίνει ότι ο αριθμός των σπερματοζωαρίων ποικίλει ανάλογα με τον θάλαμο που θα μετρηθεί. Η διαφορά στην ακρίβεια οφείλεται και στο γεγονός ότι σε κάποιους θαλάμους χρησιμοποιείται το δείγμα σπέρματος ως έχει, ενώ σε άλλους απαιτείται αραιώση με ειδικό υλικό. Στην πλάκα μέτρησης των σπερματοζωαρίων γίνεται επίσης και η μέτρηση των στρογγυλών κυττάρων αν υπάρχουν στο σπέρμα. Τα κύτταρα αυτά καταγράφονται σε εκατ/ml, όπως γίνεται με τα σπερματοζωάρια και κατόπιν διαφοροποιούνται σε δύο κατηγορίες με τη μέθοδο της υπεροξειδάσης: στα υπεροξειδάση θετικά, στα οποία βρίσκονται τα γνωστά πυοσφαίρια και τα υπεροξειδάση αρνητικά, που είναι κύτταρα της σπερματικής σειράς. Χωρίς την μέθοδο της υπεροξειδάσης δεν είναι δυνατός ο διαχωρισμός των δύο πληθυσμών.

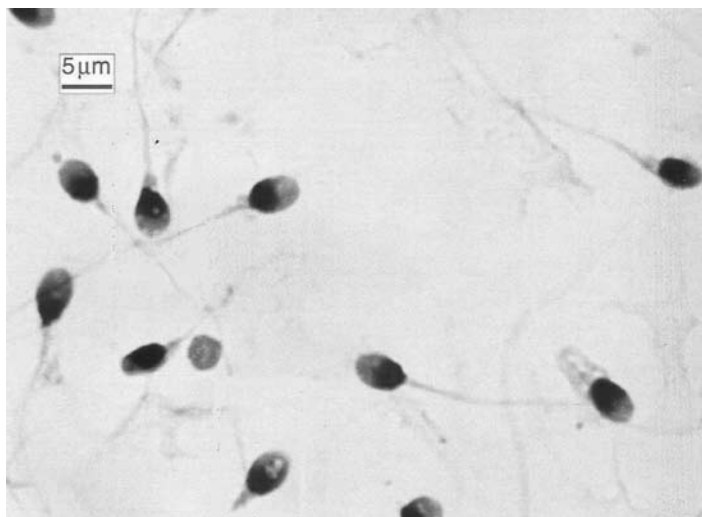


Σχ 2 Η πλάκα Neubauer για την μέτρηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων

- η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων είναι δυνατόν να εκτιμηθεί σε διαφορετικές θερμοκρασίες και ο τύπος της κίνησης των σπερματοζωαρίων είναι συνάρτηση της θερμοκρασίας μέτρησης. Τα σπερματοζωάρια θα κινηθούν πιο γρήγορα σε θερμοκρασία 37οC σε σχέση με τους 22οC, που θεωρείται θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το δείγμα του σπέρματος που μετρήθηκε στους 37οC θα παρουσιάσει υψηλότερα ποσοστά ζωνής προωθητικής κινητικότητας σε σχέση με χαμηλότερες θερμοκρασίες, με άλλα λόγια η θερμοκρασία της μέτρησης έχει σημαντική επίδραση στο εργαστηριακό αποτέλεσμα.
- η μορφολογία δεν μπορεί να εκτιμηθεί στο νωπό παρασκεύασμα γιατί και είναι απαραίτητη η χρώση των σπερματοζωαρίων (σχ 3). Αρχικά δημιουργείται επίχρισμα σπερματοζωαρίων σε αντικειμενοφόρο πλάκα, που μονιμοποιείται και στην συνέχεια γίνεται η διαδικασία της χρώσης. Σαν αποτέλεσμα τα σπερματοζωάρια χρωματίζονται και γίνεται εφικτός ο χαρακτηρισμός σε κάθε σπερματοζωάριο του μεγέθους και σχήματος της κεφαλής, του μεγέθους και σχήματος του ακροσώματος, αξιολόγηση του αυχένα και της ουράς καθώς και η ύπαρξη πιθανά κυτταροπλασματικής σταγόνας. Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τρόποι χρώσης και φυσικά η επιλογή της τεχνικής επηρεάζει το αποτέλεσμα. Το ποσοστό όμως των σπερματοζωαρίων που θα καθοριστούν ως φυσιολογικά στο βαμμένο επίχρισμα εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την εκπαίδευση του βιολόγου ή τεχνολόγου που θα αξιολογήσει τη μορφολογία.

Η ύπαρξη των διαφορετικών τεχνικών και η ασυμφωνία ανάμεσα στα εργαστήρια σπέρματος οδήγησε, αρχικά το 1980, η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (ΠΟΥ) στην

έκδοση του πρώτου εγχειριδίου για τις εργαστηριακές εξετάσεις σπέρματος. Από τότε εκδόθηκαν συνολικά 4 εγχειρίδια και αυτό που σήμερα χρησιμοποιούμε είναι η 4η έκδοση του 1999. Η ΠΟΥ, μέσα από αυτές τις εκδόσεις, καθόρισε τις εξετάσεις που πρέπει να γίνονται ρουτίνα, τις εξετάσεις που θα χρειαστούμε σε επιλεγμένες περιπτώσεις ή αυτές που πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο σε ερευνητικά πρωτόκολλα. Πρότεινε επίσης τις εργαστηριακές μεθόδους που θεωρούσε ενδεδειγμένες ώστε το αποτέλεσμα να θεωρείται αξιόπιστο.



Σχ 3 Η μορφολογία των σπερματοζωαρίων μετά από χρώση Παπανικολάου

Την προσπάθεια της ΠΟΥ ήρθε να βοηθήσει η Ευρωπαϊκή Εταιρεία για την Ανθρώπινη Αναπαραγωγή και Εμβρυολογία (European Society for Human Reproduction and Embryology, ESHRE). Αρχικά η ESHRE οργάνωσε σεμινάρια με θέμα τη βασική εξέταση σπέρματος. Τα σεμινάρια αυτά διδάσκονται σε όλο τον κόσμο με κοινό και τυποποιημένο από την ESHRE περιεχόμενο και είναι μεταφρασμένα στην γλώσσα της κάθε χώρας. Ήδη τα σεμινάρια αυτά γίνονται στον Ελλαδικό χώρο τα τελευταία 6 χρόνια. Επίσης η ESHRE μαζί με την NAFA (Nordic Association of Andrology) προχώρησε στην έκδοση ενός μικρότερου σε μέγεθος εγχειριδίου για αυτούς που χρειάζονται πληροφορίες μόνο για το σπερμοδιάγραμμα, που είναι μεταφρασμένο και στην Ελληνική γλώσσα. Εκεί αναφέρονται εργαστηριακά δεδομένα, που όσο και αν φαίνονται λεπτομέρειες, καθορίζουν την ποιότητα του αποτελέσματος. Από τις εργαστηριακές λεπτομέρειες λοιπόν των δύο εγχειριδίων αξίζει να αναφερθεί ότι πρέπει πάντα το σπερμοδιάγραμμα να γίνεται σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης, η μέτρηση του αριθμού να γίνεται μόνο μετά από αραίωση του δείγματος

με την χρήση της πλάκας Newbauer και πάντα για το δείγμα του σπέρματος η πιπέτα να είναι πιπέτα θετικής αναρρόφησης για την ακρίβεια στη δειγματοληψία. Για την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων συστήνεται η μέτρηση στους 37°C και η διαφοροποίηση τους σε 4 κατηγορίες κίνησης: ζωνηρή προωθητική, νωθρή προωθητική, επιτόπια και ακίνητα. Τόσο στη μέτρηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων όσο και στην κινητικότητά τους πρέπει να μετρείται μεγάλος αριθμός σπερματοζωαρίων (200-400 σπερματοζωάρια).

Όπως αναφέρθηκε, η ΠΟΥ εξέδωσε το πρώτο εγχειρίδιο το 1980. Σήμερα, 30 χρόνια μετά, δεν υπάρχει ακόμη ομοφωνία στο αποτέλεσμα του ίδιου δείγματος σπέρματος ανάμεσα σε διαφορετικά εργαστήρια. Για ποιους λόγους άραγε να συμβαίνει αυτό; Το δείγμα του σπέρματος παρουσιάζει ιδιαιτερότητες και ιδιομορφίες. Τα σπερματοζωάρια είναι ζωντανά κύτταρα και ο οποιοσδήποτε λάθος χειρισμός θα προκαλέσει αλλοίωση - αν όχι και μόνιμη αλλαγή - στον υπό μελέτη πληθυσμό. Όλες οι μετρήσεις είναι υποκειμενικές και, αντίθετα με άλλες εργαστηριακές μεθόδους, δεν υπάρχει αντικειμενικό πρότυπο για σύγκριση. Αν ο πληθυσμός των σπερματοζωαρίων που θα μετρηθεί είναι πολύ μικρός δεν μπορεί να θεωρηθεί αντιπροσωπευτικός του συνόλου των πολλών εκατομμυρίων που αποτελούν ένα δείγμα σπέρματος. Τότε το λάθος της μέτρησης προέρχεται από την ανακριβή δειγματοληψία.

Εκτός όμως από αυτά τα χαρακτηριστικά, και ίσως το πιο σημαντικό γεγονός, είναι η έλλειψη συστήματος ποιοτικού ελέγχου στα εργαστήρια ανδρολογίας. Στο τελευταίο εγχειρίδιο της ΠΟΥ έγινε εκτεταμένη αναφορά στο θέμα του ποιοτικού ελέγχου των εξετάσεων σπέρματος. Μόνο το «ποιοτικό» αποτέλεσμα είναι χρήσιμο στον θεράποντα ιατρό για κλινικές αποφάσεις. Στο ανδρολογικό εργαστήριο ο ποιοτικός έλεγχος έχει δύο σκέλη: τον εσωτερικό και τον εξωτερικό. Ο εσωτερικός ποιοτικός έλεγχος αποτελεί μια μορφή «αυτοελέγχου» όλων των παραμέτρων λειτουργίας του εργαστηρίου ανδρολογίας ενώ ο εξωτερικός ποιοτικός στηρίζεται στην σύγκριση των τιμών πολλών εργαστηρίων με αποτέλεσμα την ομοφωνία ανάμεσα σε διαφορετικά εργαστήρια.

Στον εσωτερικό ποιοτικό έλεγχο ο κάθε τεχνολόγος καθορίζει την επαναληψιμότητα των μετρήσεων του, κάνοντας πολλές μετρήσεις στο ίδιο δείγμα. Έτσι με άλλα λόγια ελέγχει τον εαυτό του. Παράλληλα, σε εργαστήρια στα οποία απασχολούνται περισσότερα του ενός άτομα με μετρήσεις του σπερμοδιαγράμματος, πρέπει όλα τα άτομα να μετράνε την ίδια παράμετρο με τον ίδιο τρόπο, ώστε το αποτέλεσμα να μην εξαρτάται από το ποιος κάνει την εξέταση.

Αφού καθορίσει το εργαστήριο την επαναληψιμότητα των μετρήσεων πρέπει να έχει συμφωνία με άλλα εργαστήρια. Αυτό επιτυγχάνεται με την συμμετοχή του σε συστήματα εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου, όπως αυτό του τμήματος Ανδρολογίας της ESHRE. Όλα τα εργαστήρια που συμμετέχουν σε τέτοιου είδους συστήματα

μετράνε τα ίδια δείγματα. Οι τιμές του αριθμού, της κινητικότητας και της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων βρίσκονται μέσα σε στενά όρια. Με αυτό τον τρόπο υπάρχει ένας έμμεσος τρόπος αξιολόγησης της ακρίβειας των αποτελεσμάτων. Ο ποιοτικός έλεγχος είναι μια δαπανηρή διαδικασία κυρίως από άποψη χρόνου και οργάνωσης, είναι όμως ο μόνος τρόπος να εξασφαλίσει το ανδρολογικό εργαστήριο την ποιότητα του αποτελέσματός του.

Κάνοντας όλες τις μετρήσεις ο ενδιαφερόμενος παίρνει το αποτέλεσμα του σπερμοδιαγράμματος και βέβαια αυτό που τον ενδιαφέρει είναι η απάντηση στην ερώτηση:

- Είμαι φυσιολογικός ή στην συγκεκριμένη περίπτωση είμαι γόνιμος;

Σε κάθε περίπτωση, ένα εργαστηριακό αποτέλεσμα συγκρίνεται με την φυσιολογική του τιμή. Στις περιπτώσεις των συστατικών του αίματος που με βάση τους μηχανισμούς της ομοιόστασης πρέπει να βρίσκονται σε συγκεκριμένα επίπεδα, υπάρχει ανώτερη και κατώτερη τιμή σε κάθε εργαστηριακό αποτέλεσμα. Στην περίπτωση του σπερμοδιαγράμματος ο αριθμός, η κινητικότητα ή η μορφολογία των σπερματοζωαρίων δεν ρυθμίζονται από κάποιο μηχανισμό ώστε να διατηρούνται μέσα σε συγκεκριμένα όρια. Επιπρόσθετα το ποθητό αποτέλεσμα, η σύλληψη, δεν εξαρτάται μόνο από το δείγμα του σπέρματος. Αυτό κάνει τον καθορισμό της φυσιολογικής τιμής ένα ιδιαίτερα δύσκολο εγχείρημα. Στο τελευταίο εγχειρίδιο η ΠΟΥ αντικατέστησε τον όρο «φυσιολογική τιμή» με τον όρο «τιμή αναφοράς». Και πάλι τα κριτήρια επιλογής του πληθυσμού αναφοράς δεν ήταν σαφή.

Ποιος λοιπόν μπορεί να θεωρηθεί ο σωστός πληθυσμός αναφοράς; Σε αυτή την ερώτηση προσπαθεί να δώσει οριστική απάντηση μια πολύ πρόσφατη εργασία. Μελετώντας ένα πολύ μεγάλο αριθμό περιστατικών και με την υποστήριξη της ΠΟΥ, η εργασία αυτή μελέτησε 4 ομάδες ανδρών i) ομάδα ανδρών που απέκτησαν παιδί σε διάστημα το πολύ 12 μηνών ii) ομάδα ανδρών που είχαν αποκτήσει παιδί, χωρίς να συνυπολογίζεται ο χρόνος προσπαθειών για την σύλληψη iii) ομάδα ανδρών που είχαν φυσιολογικό σπέρμα με βάση τις τιμές αναφοράς του εγχειριδίου του 1999 και iv) ομάδα ανδρών από τον γενικό πληθυσμό. Οι διαφορές στις τιμές που παρουσιάστηκαν ανάμεσα στις διαφορετικές ομάδες ήταν σημαντικές και σε ορισμένες περιπτώσεις αναμενόμενες. Με βάση λοιπόν τα καινούργια αυτά δεδομένα, μετά την κατάλληλη στατιστική επεξεργασία, ο πληθυσμός των ανδρών που απέκτησε παιδί με προσπάθειες έως και 12 μηνών ορίζεται ως ο πληθυσμός αναφοράς. Οι τιμές των παραμέτρων στα σπερμοδιαγράμματα αυτών των ανδρών θεωρούνται οι τιμές ενός γόνιμου δείγματος σπέρματος. Αυτές θα καθορίσουν τις «τιμές αναφοράς» στο καινούργιο, 5ο, εγχειρίδιο για τις εξετάσεις σπέρματος της ΠΟΥ, που πρόκειται να δημοσιευτεί σύντομα.

Σε αυτή την 5η έκδοση του εγχειριδίου της ΠΟΥ θα υπάρξει αλλαγή στην τιμή αναφοράς της μορφολογίας. Πλέον, με βάση τα δεδομένα της εργασία που προαναφέρθηκε, η φυσιολογική μορφολογία των σπερματοζωαρίων αλλάζει στο 4%. Είναι γνωστό ότι η μορφολογία είναι ίσως η παράμετρος που έχει την μεγαλύτερη συσχέτιση με την γονιμοποιητική ικανότητα ενός δείγματος σπέρματος. Η αλλαγή της τιμής προέρχεται από τον διαφορετικό τρόπο με τον οποίον πλέον πρέπει να αξιολογείται η φυσιολογική μορφολογία του σπερματοζωαρίου. Πιθανά στο καινούργιο εγχειρίδιο να υπάρξουν και άλλες αλλαγές σε άλλες παραμέτρους που προέρχονται από τις καινούργιες μελέτες. Γενικά, γίνεται πολύ έρευνα στον χώρο της εργαστηριακής ανδρολογίας γεγονός που υποδηλώνει όχι μόνο την ανάγκη για καινούργιες, τεκμηριωμένες πληροφορίες αλλά και το ενδιαφέρον που υπάρχει γύρω από το συγκεκριμένο αντικείμενο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ESHRE Monographs. Manual on Basic Semen Analysis (2002) Eds U Kvist and L. Björndahl. Oxford University Press
- World Health organization, (1999) WHO Manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th edition. Cambridge University Press, Cambridge
- Castilla et al (2003) Biological variation of seminal parameters in healthy subjects Hum Reprod vol 18, No 10, pp 25082 – 2088
- Björndahl L et al (2005) ESHRE basic semen analysis courses 1995-1999: immediate beneficial effects of standardized training Hum Reprod vol 17 No 5 pp 1299-1305
- Keel BA (2002) Quality control, quality assurance and proficiency testing in the andrology laboratory. Arch Androl 48: 417-431