

## Κλινική μελέτη

## Ο διαγνωστικός ρόλος της ανασταλτίνης-β σε υπογόνιμους άνδρες και η συσχέτισή της με την κυτταρολογική εικόνα των όρχεων

Π. Πολυχρόνου  
Θ. Μίκος  
Α. Γ. Γουλής  
Γ. Γκριμπίζης  
Α. Παπανικολάου  
Σ. Γέρου  
Β. Παυλίδου  
Β. Κ. Ταρλατζής  
Ι. Μπόντης  
Ι. Παπαδήμας

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Σκοπός:** Η ανασταλτίνη-β (Inh-β) παράγεται στα κύτταρα Sertoli ελέγχοντας με αρνητικό παλίνδρομο μηχανισμό την έκκριση της FSH. Σκοπός της εργασίας ήταν ο προσδιορισμός των βασικών και των μετά διεγερση επιπέδων της Inh-β σε υπογόνιμους άνδρες, καθώς και η συσχέτισή τους με τα ευρήματα της FNA όρχεων.

**Ασθενείς και Μέθοδοι:** Σε 67 υπογόνιμους άνδρες και 29 μάρτυρες διενεργήθηκε βασικός ορμονικός έλεγχος και δυναμική δοκιμασία Sertoli (EFSERT: προσδιορισμός επιπέδων Inh-β προ και μετά 24 και 48 ώρες από τη χορήγηση 300IU rhFSH). Σε 54 από τους υπογόνιμους άνδρες διενεργήθηκε FNA όρχεων.

**Αποτελέσματα:** Βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των υπογόνιμων ανδρών και μαρτύρων όσον αφορά στα βασικά ( $55,8 \pm 6,3$  έναντι  $115,7 \pm 10,0$  pg/ml, αντίστοιχα,  $p < 0,001$ ), αλλά όχι τα διεγερμένα επίπεδα Inh-β ( $64,6 \pm 9,3$  έναντι  $69,7 \pm 8,9$  pg/ml,  $p = \text{ΜΣ}$  στις 24 ώρες και  $63,3 \pm 11,4$  έναντι  $88,0 \pm 10,3$  pg/ml,  $p = \text{ΜΣ}$  στις 48 ώρες). Σύμφωνα με τα βασικά επίπεδα της Inh-β, οι ασθενείς με INOA ή κρυπορχία εμφάνιζαν τη σοβαρότερη βλάβη στα κύτταρα Sertoli με τους ασθενείς με κίρσοκλήλη να ακολουθούν. Υπήρξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των βασικών επιπέδων Inh-β και των αποτελεσμάτων της FNA ( $r = -0,475$ ,  $p < 0,01$ ) με τα χαμηλότερα επίπεδα Inh-β να αντιστοιχούν σε βαρύτερες κυτταρολογικές διαγνώσεις (απλασία σπερματικού επιθηλίου-SCOS και διακοπή της σπερματογένεσης). Η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη ROC ως προς την ανεύρεση σπερματοζωαρίων στην FNA ήταν 0,663 για την FSH και 0,725 για την Inh-β με τον ουδό των 54 pg/ml να εμφανίζει ευαισθησία 59% και ειδικότητα 86%. Εφαρμόζοντας τη μέθοδο της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης στις μεταβλητές ηλικίες, μέσο μέγεθος όρχεων, FSH, T και βασική τιμή Inh-β, βρέθηκε ότι μόνο η Inh-β συνεισφέρει σημαντικά στην πρόβλεψη του αποτελέσματος της FNA ( $r^2 = 0,308$ ,  $p < 0,001$ ).

**Συμπεράσματα:** Τα βασικά επίπεδα ορού της Inh-β φαίνεται να αποτελούν σημαντική διαγνωστική παράμετρο στην ανδρική υπογονιμότητα, καθώς αντανακλούν τις εφεδρείες των κυττάρων Sertoli και εμφανίζουν σημαντική συσχέτιση με την κυτταρολογική εικόνα. Από την άλλη, η εκτίμηση των εφεδρειών των κυττάρων Sertoli, όπως προκύπτει από τη δοκιμασία EFSERT, δεν φαίνεται να προσφέρει επιπλέον πληροφορίες στη διαγνωστική και θεραπευτική προσέγγιση

Μονάδα Ενδοκρινολογίας  
Αναπαραγωγής, Α' Μαιευτική και  
Γυναικολογική Κλινική ΑΠΘ

Αλληλογραφία:  
Δημήτριος Γ. Γουλής  
Α' Μαιευτική – Γυναικολογική Κλινική  
ΑΠΘ, ΓΝΘ «Παπαγεωργίου»  
Περιφερειακή Οδός, Νέα Ευκαρπία  
56 403 Θεσσαλονίκη  
Τηλ.: 2310 991520  
Fax: 2310 991510  
E-mail: dimitrios.goulis@otenet.gr  
Κατατέθηκε: 23/10/06  
Εγκρίθηκε: 12/12/06

**Πίνακας 1.** Αιτιολογική ταξινόμηση των υπογόνιμων ανδρών

Διάγνωση	n (%)
Ιδιοπαθής μη αποφρακτική αζωοσπερμία (INOA)	31 (46)
με LOH	5
χωρίς LOH	26
Κιρσοκήλη	14 (21)
Κρυφορχία	10 (15)
Άλλα αίτια	12 (18)
Υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός: Σύνδρομο Kallmann	3
Υπεργοναδοτροπικός υπογοναδισμός: Σύνδρομο Klinefelter	2
Συγγενής απλασία των εκφορητικών οδών του σπέρματος	2
Σύνδρομο ορχικής δυσγενεσίας	1
Σύνδρομο ανδρών με καρύτυπο 46, XX	1
Σύνδρομο «vanishing testes»	1
Σεξουαλική δυσλειτουργία	1
Μικροδρεπανοκυτταρική αναιμία	1
<b>Σύνολο</b>	<b>67 (100)</b>

LOH: Late-Onset Hypogonadism (όψιμος υπογοναδισμός)

του υπογόνιμου άνδρα.

**Όροι ευρητηρίου:** ανασταλτίνη-β, FSH, βιοψία διά λεπτής βελόνης (FNA), ανδρική υπογονιμότητα.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανασταλτίνη-β (Inh-β) είναι μία διμερής γλυκοπρωτεΐνη, μέλος της οικογένειας του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα-β (Transforming Growth Factor-β, TGF-β), η οποία εκκρίνεται στους άνδρες σχεδόν αποκλειστικά από τα κύτταρα Sertoli<sup>1-3</sup>. Αν και ο ρόλος της στην ανδρική υπογονιμότητα δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί, η κύρια δράση της φαίνεται ότι είναι ο έλεγχος της σύνθεσης και έκκρισης της θυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) με αρνητικό παλίνδρομο μηχανισμό<sup>4,6</sup>. Επιπρόσθετα, η έκκριση της Inh-β ρυθμίζεται τόσο από την FSH, όσο και από τα κύτταρα της σπερματογένεσης<sup>7,8</sup>.

Τα κύτταρα Sertoli υποστηρίζουν τη σπερματογένεση μέσω πολλαπλών παρακρινικών μηχανισμών<sup>9</sup>. Τα επίπεδα της Inh-β είναι μη ανιχνεύσιμα σε άνδρες με απλασία του σπερματικού επιθηλίου (Sertoli Cell-Only Syndrome - SCOS), παρά τα φυσιολογικά επίπεδα τεστοστερόνης (T)<sup>10</sup>. Επιπλέον, χορήγηση σε άνδρες ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) ή ανθρώπιου χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG) δεν αυξάνει τα επί-

πεδα της Inh-β του ορού<sup>11,12</sup>, γεγονός που υποδηλώνει ότι η συμβολή των κυττάρων Leydig στην κυκλοφορούσα Inh-β πρέπει να είναι πολύ μικρή. Παρόλα αυτά, τα κύτταρα Leydig παίζουν έναν παρακρινικό ρόλο στη ρύθμιση της παραγωγής της Inh-β από τα κύτταρα Sertoli<sup>13</sup>. Για όλους αυτούς τους λόγους η Inh-β θεωρείται ως άμεσος δείκτης της λειτουργικότητας των κυττάρων Sertoli και ως έμμεσος δείκτης της σπερματογένεσης.

Η κυτταρολογική εξέταση ορχικού υλικού με αναρροφητική βιοψία διά λεπτής βελόνης (FNA) μας επιτρέπει να εκτιμήσουμε την κατάσταση των σπερματικών σωληναρίων και να αναγνωρίσουμε τα διάφορα κύτταρα της σπερματικής σειράς (σπερματογόνα, σπερματοκύτταρα πρώτης και δεύτερης τάξης, σπερματίδες και σπερματοζωάρια), καθώς και τα κύτταρα Sertoli<sup>14</sup>. Έτσι, η FNA μπορεί να αποτελέσει μία μέθοδο αναφοράς για την εκτίμηση της Inh-β ως δείκτη της σπερματογένεσης.

Ο κύριος σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση της κλινικής αξίας των βασικών και των διεγερμένων επιπέδων της Inh-β στον ορό ως δεικτών της λειτουργικότητας των κυττάρων Sertoli και της ανεύρεσης ή μη σπερματοζωαρίων κατά την FNA σε υπογόνιμους άνδρες. Δευτερεύων σκοπός της μελέτης ήταν η σύγκριση της Inh-β με την FSH ως προς την προγνωστι-

**Πίνακας 2.** Χαρακτηριστικά των υπογόνιμων ανδρών και αποτελέσματα της μελέτης

	INOA	Κρυφορχία	Κιρσοκήλη	Άλλα αίτια	τιμή p
n	31	10	14	12	
<b>Κλινικός έλεγχος</b>					
Ηλικία (έτη)	32,7 ± 1,1	31,1 ± 1,6	35,9 ± 1,6	30,5 ± 2,5	ΜΣ
Μέσο μέγεθος όρχεων (ml)	13,2 ± 1,1	13,3 ± 1,2	20,2 ± 1,5	11,8 ± 3,4	ΜΣ
<b>Ορμονικός έλεγχος</b>					
FSH (mU/ml)	21,2 ± 4,0	17,8 ± 2,8	11,8 ± 2,8	22,1 ± 7,5	ΜΣ
LH (mU/ml)	7,3 ± 0,9	6,6 ± 0,8	7,0 ± 1,6	9,4 ± 2,7	ΜΣ
Προλακτίνη (ng/ml)	11,9 ± 1,4	12,0 ± 1,9	8,0 ± 1,5	14,4 ± 3,7	ΜΣ
Ολική Τεστοστερόνη (ng/dl)	325 ± 27	358 ± 63	468 ± 82	239 ± 69	ΜΣ
<b>Σπερμοδιάγραμμα</b>					
Όγκος (ml)	3,4 ± 0,3	2,6 ± 0,4	4,9 ± 0,6 <sup>1,2</sup>	2,5 ± 1,3	0,02
Αριθμός (x 10 <sup>6</sup> / ml)	2,1 ± 0,8	3,6 ± 2,1	7,5 ± 2,5 <sup>1,3</sup>	0,0 ± 0,0	0,01
Κινητικότητα 1 <sup>h</sup> ώρας (%)	4,2 ± 1,4	6,9 ± 3,9	15,0 ± 4,2	8,0 ± 8,0	ΜΣ
Φυσιολογική μορφολογία (%)	3,8 ± 2,0	3,6 ± 1,9	15,4 ± 6,0 <sup>1</sup>	0,0 ± 0,0	0,05
Ολικό Λειτουργικό Κλάσμα	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,2	3,0 ± 1,9 <sup>1</sup>	0,0 ± 0,0	ΜΣ
<b>Κυτταρολογικός έλεγχος</b>					< 0,05
Φυσιολογικός	0	0	0	1	
Υποσπερματογένεση	11	2	9	1	
Αναστολή ωρίμανσης	9	3	1	2	
SCOS	4	3	0	2	

Τα στοιχεία παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± συστηματικό σφάλμα (SEM). Η τιμή p αναφέρεται στη σύγκριση όλων των ομάδων μεταξύ τους (δοκιμασίες Kruskal-Wallis ή Chi-square).

<sup>1</sup>p < 0,05 μεταξύ των ομάδων «INOA» και «κιρσοκήλης» (δοκιμασία Mann-Whitney-U).

<sup>2</sup>p < 0,05 μεταξύ των ομάδων «κρυφορχίας» και «κιρσοκήλης» (δοκιμασία Mann-Whitney-U).

<sup>3</sup>p < 0,05 μεταξύ των ομάδων «κιρσοκήλης» και «άλλα αίτια» (δοκιμασία Mann-Whitney-U).

INOA: Idiopathic-Non-Obstructive Azospermia (Ιδιοπαθής μη αποφρακτική αζωοσπερμία), SCOS: Sertoli Cell-Only Syndrome (απλασία του σπερματικού επιθηλίου), ΜΣ: Μη στατιστικά σημαντικό.

Το Ολικό Λειτουργικό Κλάσμα υπολογίστηκε ως: [όγκος σπέρματος (ml)] x [αριθμός σπερματοζωαρίων (10<sup>6</sup>)] x [κινητικότητα 1<sup>h</sup> ώρας (%)] x [φυσιολογική μορφολογία (%)] / 10<sup>4</sup>.

κή αξία τους σχετικά με την ανεύρεση σπερματοζωαρίων.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### • Ασθενείς

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 67 υπογόνιμοι άν-

δρες (μέση ηλικία 32,8 ± 0,6 έτη) που εκτιμήθηκαν στη Μονάδα Ενδοκρινολογίας Αναπαραγωγής. Όλοι οι άνδρες υποβλήθηκαν σε πλήρη έλεγχο (ιστορικό, κλινική εξέταση, ορμονικός έλεγχος [FSH, LH, ολική T, προλακτίνη (PRL), Inh-β] και σπερμοδιάγραμμα (τουλάχιστον δύο δείγματα σπέρματος με χρονική

Πίνακας 3. Βασικά και διεγερμένα επίπεδα

	Μάρτυρες	ΙΝΟΑ	Κρηφορχία
n	29	31	10
Inh-β (pg/ml) στις 0 ώρες	115,7 ± 10,0 <sup>1</sup>	46,6 ± 6,5	28,1 ± 3,6
Inh-β (pg/ml) στις 24 ώρες	69,7 ± 8,9	60,7 ± 14,9	26,1 ± 5,8
Inh-β (pg/ml) στις 48 ώρες	88,0 ± 10,3	67,2 ± 22,8	38,5 ± 7,7
τιμή p	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ

Τα στοιχεία παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± συστηματικό σφάλμα (SEM). Η τιμή p αναφέρεται στη σύγκριση μεταξύ όλων των ομάδων (δοκιμασία Kruskal-Wallis) ή μεταξύ διαφορετικών στιγμιότυπων στην ίδια ομάδα (δοκιμασία Friedman).

<sup>1</sup>p < 0,05 μεταξύ «μαρτύρων» και όλων των άλλων ομάδων (δοκιμασία Mann-Whitney-U).

<sup>2</sup>p < 0,05 μεταξύ «ΙΝΟΑ» και «κρηφορχίας» (δοκιμασία Mann-Whitney-U).

<sup>3</sup>p < 0,05 μεταξύ «κρηφορχίας» και «κρηφορχίας» (Mann-Whitney-U test).

ΙΝΟΑ: Non-Obstructive Azoospermia (Ιδιοπαθής μη αποφρακτική αζωοσπερμία), ΜΣ: Μη στατιστικά σημαντικό.

απόσταση δύο μηνών). Από τους 67 υπογονίμους άνδρες, οι 54 υποβλήθηκαν σε FNA όρχεων. Ανάλογα με τις κλινικές ενδείξεις εκτελέστηκε απεικονιστικός (υπερηχογράφημα οσχέου, έγχρωμο Doppler, αξονική τομογραφία πυέλου), καθώς και γενετικός έλεγχος (καρυότυπος, μικροελλείψεις του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος Y - Yq microdeletions). Επιπρόσθετα, 29 νέοι υγιείς άνδρες (30,3±5,1 ετών) χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου. Η μελέτη εγκρίθηκε από την επιτροπή Βιοηθικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

#### • Μέθοδοι

Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των FSH, LH, T και PRL στον ορό με τη μέθοδο της ανοσοφωταύγειας (Immulite 2000, DPC, USA). Τα επίπεδα της Inh-β στον ορό μετρήθηκαν με ανοσοενζυμική μέθοδο (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA) τύπου "sandwich" (DSL-10-84100 ACTIVE<sup>®</sup> Inhibin-B Elisa, Diagnostic Systems Laboratories Inc). Σύμφωνα με τον κατασκευαστή, οι συντελεστές μεταβλητότητας στην ίδια (intra-assay variation) ή σε διαφορετικές (inter-assay variation) διαδικασίες μέτρησης ήταν 3,5% και 6,2%, αντίστοιχα. Η ευαισθησία της μεθόδου ήταν 7pg/ml.

Όλοι οι υπογονίμοι άνδρες υποβλήθηκαν σε EFSESTest [Exogenous FSH Sertoli Reserve Test: εκτίμηση των επιπέδων της Inh-β στον ορό αίματος, πριν και 24 και 48 ώρες μετά από χορήγηση 300 IU rhFSH ενδομυϊκά (Gonal-F<sup>®</sup>, Serono)]. Τα δείγματα αίματος συλλέγονταν μεταξύ 09:00 και 10:00 από την μεσοβασιλική φλέβα για τρεις συνεχόμενες ημέρες.

Την πρώτη ημέρα συλλέγονταν δύο δείγματα αίματος με χρονική διαφορά 30 min για την επαλήθευση των βασικών τιμών της Inh-β. Τα δείγματα φυγοκεντρώνταν για 20 λεπτά και ο ορός διαχωριζόταν και αποθηκευόταν μέχρι να αναλυθεί στους -20oC.

Πενήντα τέσσερις από τους 67 υπογονίμους άνδρες δέχθηκαν να υποβληθούν σε αμφοτερόπλευρη FNA όρχεων. Η αναρρόφηση εκτελούνταν με τοπική αναισθησία μέσω μίας «πεταλούδας» διαμέτρου 23-G, προσαρμοσμένης σε μία κενή σύριγγα μίας χρήσης στον κάθε πόλο του κάθε όρχι (συνολικά τέσσερα δείγματα ανά άνδρα). Το υλικό παρασκευαζόταν με τη μέθοδο της υγρής φάσης (σύστημα Thin Prep<sup>®</sup>) και εξεταζόταν τόσο από κυτταρολόγο, όσο και από παθολογοανατόμο εξειδικευμένο στην ιστολογική μελέτη των όρχεων.

#### • Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (Standard Error of the Mean - SEM). Για τη σύγκριση των συνεχών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμασίες Kruskal-Wallis και Friedman, ενώ για τις μη συνεχείς μεταβλητές η δοκιμασία Chi-square. Οι καμπύλες ROC (Receiver Operative Characteristics) ορίστηκαν για την Inh-β και την FSH χρησιμοποιώντας την FNA ως μέθοδο αναφοράς. Επιπρόσθετα, εφαρμόστηκε η μέθοδος της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης με την ηλικία, το μέσο μέγεθος των όρχεων, την FSH, την T και τις βασικές τιμές της Inh-β ως ανεξάρτητες μεταβλητές και τα αποτελέσματα της FNA ως εξαρτημένη μεταβλητή. Τιμή p<0,05 (5%) θεωρήθηκε

## Inh-β μαρτύρων και υπογόνιμων ανδρών

Κιρσοκήλη	Άλλα αίτια	τιμή p
14	12	
84,0 ± 15,8 <sup>2,3</sup>	70,0 ± 21,9	< 0,001
81,8 ± 17,7	85,1 ± 28,6	< 0,05
68,9 ± 17,9	62,5 ± 19,2	ΜΣ
ΜΣ	ΜΣ	

στατιστικά σημαντική. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού SPSS 12.0 (Statistical Package for Social Sciences for Windows, SPSS Inc, Chicago, Ill).

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

Οι 67 υπογόνιμοι άνδρες της μελέτης ταξινομήθηκαν αιτιολογικά με βάση τον κλινικό, ορμονικό, σπερματολογικό, κυτταρολογικό και γενετικό έλεγχο (πίνακας 1). Στην πλειοψηφία των υπογόνιμων ανδρών τέθηκε η διάγνωση της ιδιοπαθούς μη αποφρακτικής αζωοσπερμίας (Idiopathic-Non Obstructive Azoospermia – INOA) που χαρακτηρίζεται από πρωτοπαθή υπογονιμότητα, ελαττωμένο μέγεθος των όρχεων, αυξημένα επίπεδα FSH και σοβαρή oligo-τερατο-ασθenoσπερμία (ΟΤΑ) ή αζωοσπερμία. Σε πέντε από τους άνδρες με INOA ετέθη επιπλέον η διάγνωση του όψιμου υπογοναδισμού (Late-Onset Hypogonadism – LOH). Άλλες συνήθεις διαγνώσεις ήταν η κιρσοκήλη (n = 14) και η κρυφορχία (n = 10) (πίνακας 1). Όλες οι κλινικές και εργαστηριακές παράμετροι των υπογόνιμων ανδρών που μελετήθηκαν απεικονίζονται στον πίνακα 2.

Υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του συνόλου των υπογόνιμων ανδρών (n = 67) και των μαρτύρων (n = 29) ως προς τα βασικά επίπεδα της Inh-β (55,8 ± 6,3 έναντι 115,7 ± 10,0pg/ml αντίστοιχα, p < 0,001) (πίνακας 3). Επιπρόσθετα, τα βασικά επίπεδα της Inh-β αυξάνονταν σημαντικά καθώς προχωρούσαμε από τις σοβαρότερες (28,1 ± 3,6 pg/ml στην κρυφορχία) σε λιγότερο σοβαρές

ορχικές βλάβες (84,0 ± 15,8 pg/ml στην κιρσοκήλη) (πίνακας 3).

Οι συγκεντρώσεις της Inh-β στον ορό προ, 24 και 48 ώρες μετά από χορήγηση 300IU rhFSH στις ομάδες των μαρτύρων και των υπογόνιμων ανδρών απεικονίζονται στον πίνακα 3. Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση της Inh-β στις 24 και 48 ώρες σε καμία από τις ομάδες που μελετήθηκαν (p < 0,05).

Υπήρξε σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ των βασικών επιπέδων της Inh-β ορού και της FSH στο σύνολο των υπογόνιμων ανδρών (r = -0,460, p < 0,01) (σχήμα 1α) και σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των βασικών επιπέδων της Inh-β ορού και του μέσου μεγέθους των όρχεων (r = 0,580, p < 0,01) (σχήμα 1β).

Τα αποτελέσματα της FNA (n = 54) ταξινομήθηκαν σε επτά κατηγορίες με αύξουσα σειρά βαρύτητας της βλάβης στη σπερματογένεση ως εξής: 1: φυσιολογική σπερματογένεση, 2: ήπια υποσπερματογένεση, 3: βαρεία υποσπερματογένεση, 4: μερική διακοπή της σπερματογένεσης, 5: πλήρης διακοπή της σπερματογένεσης, 6: μερικό (εστιακό) SCOS, 7: πλήρες SCOS. Με βάση αυτή την ταξινόμηση βρέθηκε σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ των βασικών επιπέδων της Inh-β ορού και της ορχικής FNA (r = -0,475, p < 0,01 και r = -0,545, p < 0,01 μετά από διόρθωση ως προς την ηλικία) (σχήμα 2).

Υπολογίσθηκαν οι καμπύλες ROC για την Inh-β και τους λόγους 1/FSH και Inh-β/FSH ως προγνωστικούς δείκτες ανεύρεσης σπερματοζωαρίων κατά την FNA (σχήμα 3). Η ανεύρεση σπερματοζωαρίων θεω-

**Πίνακας 4.** Συστηματική ανασκόπηση των μελετών που αναφέρονται στην προγνωστική αξία των επιπέδων της Inh-β ορού ως δείκτη παρουσίας σπερματοζωαρίων στους όρχεις σε άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία

Πρώτος συγγραφέας (βιβλιογραφική αναφορά)	Ομάδα NOA (n)	Μάρτυρες (n)	Μέθοδος αναφοράς	Συμπέρασμα <sup>1</sup>
1.Liu YC (20)	40	20 OA 10 υγιείς	TESE	Inh-β
2.Bailly M (21)	75	81 OA	TESE	Inh-β
3.Bohring C (22)	52	-	TESE	συνδυασμός
4.Brugo-Olmedo S (23)	78	15 OA 10 υγιείς	TESE	Inh-β
5.Von Eckardstein S (24)	52	-	TESE	συνδυασμός
6.Nagata Y (25)	62	-	TESE	Inh-β
7.Ballesca JL (26)	17	22 OA 29 υγιείς	TESE	Inh-β
Παρούσα μελέτη	67	29 υγιείς	FNA	Inh-β

<sup>1</sup>Inh-β: η Inh-β είναι ανώτερη της FSH ως προγνωστικός παράγοντας παρουσίας σπερματοζωαρίων. Συνδυασμός: ο συνδυασμός Inh-β και FSH είναι ανώτερος των μεμονωμένων ορμονών ως προγνωστικός παράγοντας παρουσίας σπερματοζωαρίων.

NOA: Non-Obstructive Azoospermia, OA: Obstructive Azoospermia, TESE: Testicular Sperm Extraction, FNA: Fine Needle Aspiration.

ρήθηκε θετική με την ανεύρεση έστω και ενός σπερματοζωαρίου στην FNA (κυτταρολογική διάγνωση φυσιολογικής σπερματογένεσης, ήπιας ή βαρείας υποσπερματογένεσης, μερικής διακοπής της σπερματογένεσης και μερικού SCOS). Η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη ROC για την Inh-β ήταν 0,725, με τον ουδό των 54pg/ml να εμφανίζει ευαισθησία 59% και ειδικότητα 86% ως προς την ανεύρεση σπερματοζωαρίων κατά την FNA. Η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη ROC για την Inh-β ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από εκείνη των λόγων 1/FSH ή Inh-β/FSH (0,663 και 0,716, αντίστοιχα) (σχήμα 3).

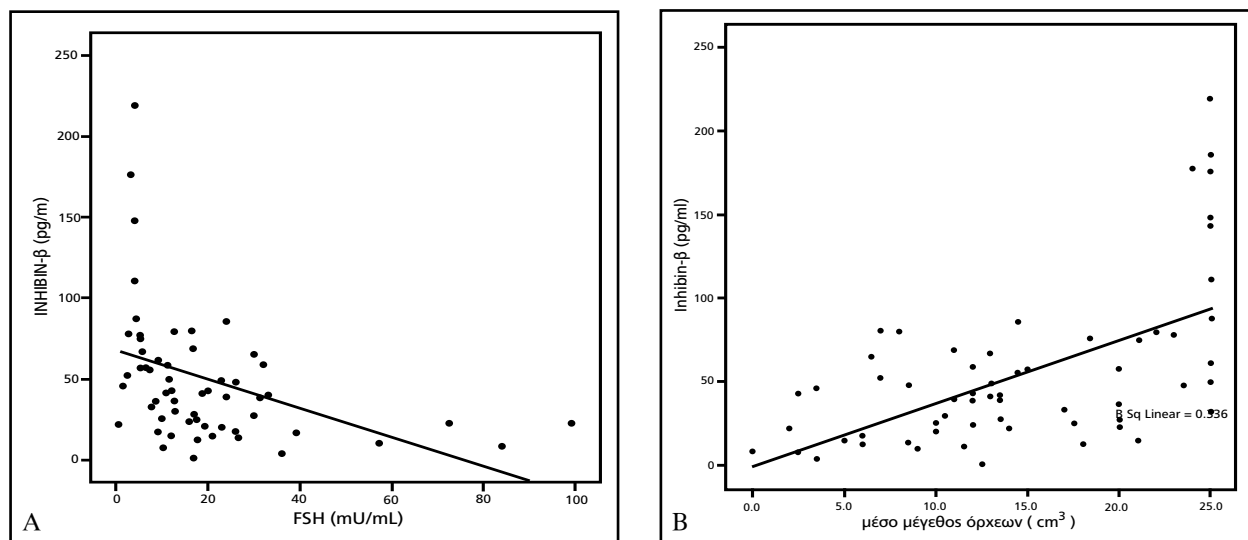
Τέλος, εφαρμόστηκε η μέθοδος της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης για να εκτιμηθεί η δυνατότητα μιας σειράς κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων να προβλέπουν τα αποτελέσματα της FNA. Ειδικότερα, τα αποτελέσματα της FNA ορίστηκαν ως εξαρτημένη μεταβλητή, ενώ η ηλικία, το μέγεθος των όρχεων, η FSH, η T και οι βασικές τιμές της Inh-β ως ανεξάρτητες μεταβλητές. Όλες οι ανεξάρτητες μεταβλητές απορρίφθηκαν από το τελικό μοντέλο με την εξαίρεση της Inh-β, η οποία φαίνεται

ότι ερμηνεύει το 30% των αποτελεσμάτων της FNA ( $r^2 = 0,308$ ,  $p < 0,001$ ).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η Inh-β φαίνεται ότι αποτελεί χρήσιμο δείκτη της σπερματογένεσης, καθώς υπάρχουν δεδομένα ότι υπάρχει σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των βασικών επιπέδων της ορμόνης και της σπερματογένεσης<sup>15-19</sup>. Επιπρόσθετα, η εισαγωγή της ενδοωαριακής έγχυσης σπερματοζωαρίων (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection – ICSI) έχει καταστήσει την ανεύρεση έστω και ενός σπερματοζωαρίου γεγονός μεγάλης σημασίας για τον αζωοσπερμικό άνδρα. Έτσι, ως σκοπός αυτής της μελέτης τέθηκε η διερεύνηση της κλινικής σημασίας των βασικών και των διεγερμένων επιπέδων της Inh-β ορού ως δείκτη της λειτουργικότητας των κυττάρων Sertoli και της ανεύρεσης σπερματοζωαρίων κατά την FNA σε υπογόνιμους άνδρες.

Νεότερες μελέτες επιχείρησαν να συσχετίσουν τα επίπεδα της Inh-β ορού με την εικόνα των όρχεων σε ανοικτές βιοψίες<sup>20-26</sup> (πίνακας 4). Άλλοι ερευνητές χρησιμοποίησαν την Inh-β και την FNA μόνο για να



**Σχήμα 1.** Συσχέτιση των βασικών τιμών της inhibin-β με (Α) τις βασικές τιμές της FSH και (Β) το μέσο μέγεθος των όρχεων σε υπογόνιμους άνδρες.

προσδιορίζουν μια ομάδα ανδρών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία ή ΟΤΑ με σκοπό τη θεραπεία τους με ανασυνδυασμένη FSH<sup>27-29</sup>. Ωστόσο, η μελέτη αυτή παρουσιάζει τρία νέα στοιχεία:

1. Είναι η πρώτη που χρησιμοποιεί τη διαγνωστική FNA και όχι την ανοικτή βιοψία όρχεων (Testicular Sperm Extraction – TESE) ως μέθοδο αναφοράς.
2. Αναφέρεται όχι μόνο σε άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία, αλλά σε άνδρες με ακριβή διάγνωση (INOA, κισσοκήλη, κρυφορχία).
3. Εφαρμόζει πολλαπλές στατιστικές μεθόδους (άμεση σύγκριση των ομάδων, καμπύλες ROC, γραμμική παλινδρόμηση) με σκοπό τη σύγκριση της Inh-β με την FSH που αποτελεί την πλέον αναγνωρισμένη ορμονική παράμετρο στη διερεύνηση της ορχικής λειτουργίας και ιδιαίτερα της σπερματογένεσης.

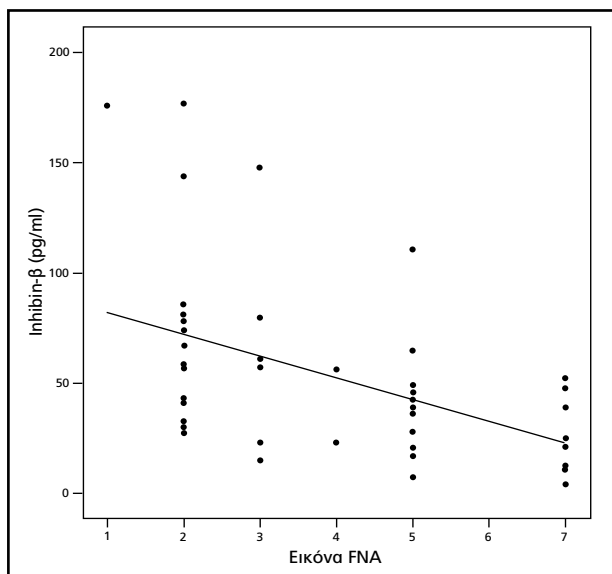
Πολλοί ειδικοί προτιμούν την εφαρμογή της TESE αντί της FNA στη διερεύνηση του άνδρα με μη αποφρακτική αζωοσπερμία (πίνακας 4). Ένας από τους κύριους λόγους αυτής της προτίμησης είναι η ικανότητα της TESE να αναγνωρίζει περιπτώσεις με ενδοσωληνιαριακή νεοπλασία (Intra-Tubular Germ Cell Neoplasia - ITGCN – παλαιότερη ορολογία: Carcinoma In-Situ), μια διάγνωση που εμφανίζεται με αυξημένη συχνότητα σε υπογόνιμους άνδρες<sup>30-31</sup>. Ωστόσο, πιστεύουμε ότι η FNA όρχεων αποτελεί ένα σημαντικό κομμάτι της διαγνωστικής και θεραπευτικής προσέγγισης του υπογόνιμου άνδρα. Σε σύγκριση με την ανοικτή βιοψία των όρχεων, η FNA προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα, καθώς είναι γρήγορη, φθηνή, σχεδόν ατραυματική και ελάχιστα

επεμβατική ως μέθοδος<sup>32-33</sup>. Φυσικά, πέρα από την κυτταρολογική διάγνωση, η FNA καθιστά δυνατή τη συλλογή σπερματοζωαρίων, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ICSI, κυρίως σε άνδρες με αποφρακτική αζωοσπερμία.

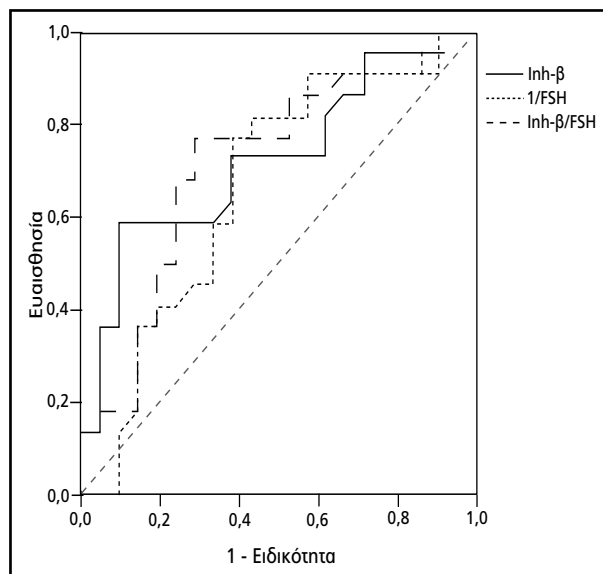
Όσον αφορά στον κύριο σκοπό της μελέτης, δείχθηκε ότι οι βασικές τιμές της Inh-β αντανακλούν με ακρίβεια τη λειτουργία των κυττάρων Sertoli, καθώς υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ των βασικών τιμών της Inh-β και των αποτελεσμάτων της FNA. Από την άλλη μεριά, τα διεγερμένα επίπεδα της Inh-β, όπως εκτιμήθηκαν με το EFSERT, δεν προσέφεραν επιπρόσθετες πληροφορίες στη διαγνωστική προσέγγιση του υπογόνιμου άνδρα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε αντίθεση με εκείνα προηγούμενης μελέτης<sup>34</sup>, όπου περιγράφηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων της Inh-β μετά από χορήγηση ανασυνδυασμένης FSH σε υγιείς άνδρες, καθώς και σε άνδρες με ελαφρά βλάβη της σπερματογένεσης.

Όσον αφορά στο δευτερεύοντα σκοπό της μελέτης, δείχθηκε ότι οι βασικές τιμές της Inh-β αποτελούν πιο ευαίσθητο προγνωστικό δείκτη ανεύρεσης σπερματοζωαρίων κατά την FNA από την FSH μόνο ή από τον λόγο Inh-β/FSH.

Συμπερασματικά, τα βασικά επίπεδα της Inh-β ορού φαίνεται να αποτελούν αξιόπιστο δείκτη της λειτουργικότητας των κυττάρων Sertoli, καθώς αντανακλούν το βαθμό της ορχικής βλάβης. Η Inh-β μπορεί να είναι πιο ευαίσθητη από την FSH ως προγνωστικός δείκτης της ανεύρεσης σπερματοζωαρίων κατά την FNA, παρότι η ευαισθησία και η ειδικότητά της είναι σχετικά χαμηλή. Σε κάθε περίπτωση, τα διεγερμένα επίπεδα της Inh-β, όπως εκτιμήθηκαν από



**Σχήμα 2.** Συσχέτιση των βασικών επιπέδων της Inh-β και των αποτελεσμάτων της FNA. Τα αποτελέσματα της FNA ταξινομήθηκαν σε επτά κατηγορίες από την ηπιότερη προς τη σοβαρότερη διαταραχή της σπερματογένεσης. 1: φυσιολογική σπερματογένεση, 2: ήπια υποσπερματογένεση, 3: βαρεία υποσπερματογένεση, 4: μερική διακοπή της σπερματογένεσης, 5: πλήρης διακοπή της σπερματογένεσης, 6: μερικό SCOS, 7: πλήρες SCOS.



**Σχήμα 3.** Καμπύλη Receiver Operating Characteristic (ROC) των βασικών επιπέδων της Inh-β ορού και των λόγων 1/FSH and Inh-β/FSH ως προς την πρόβλεψη ανάκτησης σπερματοζωαρίων κατά την FNA όρχεων.

το EFSERT, δεν φαίνεται να προσφέρουν επιπρόσθετες πληροφορίες για τη λειτουργικότητα των κυττάρων Sertoli. Ασφαλώς απαιτούνται περισσότερες προοπτικές και καλά σχεδιασμένες μελέτες για να προσδιορισθεί ο ρόλος της Inh-β στην ανδρική υπογονιμότητα, ειδικά σε συνδυασμό με άλλες σημαντικές ορμόνες του ορχικού μικροπεριβάλλοντος, όπως η ανασταλτική ορμόνη των πόρων του Müller (Anti-Müllerian Hormone - AMH).

**Summary**

*Polychronu P, Mikos T, Goulis DG, Grimbizis G, Papanikolaou A, Gerou S, Pavlidou B, Tarlatzis BK, Bontis J, Papadimas J*

*The diagnostic role of Inhibin-β in subfertile men and its correlation with histologic findings of the testis Helen Obstet Gynecol 19(4):343-352, 2007*

Objective: Inhibin-β (Inh-β) is produced by Sertoli cells and controls FSH secretion through a negative feedback mechanism. The aim of this study was to investigate the clinical value of basal and stimulated serum Inh-β levels as a marker of Sertoli cell function and as a predictor of sperm recovery in FNA performed in subfertile men.

Design: We studied 67 subfertile men through basal hormonal as well as dynamic Sertoli-cell test (EFSERT: serum Inh-β levels before and 24h and 48h after administration of 300IU rhFSH intramuscularly). Fifty-four of the subfertile men underwent testicular Fine Needle Aspiration (FNA). Twenty-nine young healthy men were used as a control group.

Results: There was significant difference between subfertile and control men regarding the basal (55.8±6.3 vs. 115.7±10.0 pg/ml respectively, p <0,001) but not the stimulated Inh-β levels (64.6±9.3 vs. 69.7±8.9 pg/ml, p=NS at 24h and 63.3±11.4 vs. 88.0±10.3 pg/ml, p=NS at 48h). There was significant correlation between basal Inh-β levels and FNA findings (r = -0.475, p <0.01). Area Under Curve in a Receiver Operating Characteristic curve was higher for Inh-β than FSH (0.725 vs. 0.663 respectively) for prediction of sperm retrieval in a single testicular FNA with a threshold of Inh-β 54pg/ml having a sensitivity of 59% and a specificity of 86%.

Conclusion: Basal serum Inh-β levels seem to constitute an important diagnostic parameter in male subfertility, as they reflect both Sertoli cell function and testicular cytology better than FSH levels.



**Key words:** *Inhibin-β, FSH, FNA, male subfertility.*

#### **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Winters SJ, Plant TM. Partial characterization of circulating inhibin-B and Pro-αC during development in the male rhesus monkey. *Endocrinology* 1999; 140:5497–5504.
2. Bernard DJ, Chapman SC, Woodruff TK. Minireview: Inhibin Binding Protein (InhBP/p120), Betaglycan, and the continuing search for the inhibin receptor. *Molecular Endocrinology* 2002; 16:207–212.
3. Heyes FJ, Pitteloud N, DeCruz S, Crowley WF, Boepple PA. Importance of Inhibin B in the regulation of FSH secretion in the human male. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:5541–5546.
4. Sanriago BM, Sabrina DV, Juan C, Fernando U, Florencia N, Anibal A. Serum inhibin B may be a reliable marker of the presence of testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2001; 76:1124–1129.
5. Vernaev V, Tournaye H, Schiettecatte J, Verheyen G, Van Steirteghem A, Devroey P. Serum inhibin B cannot predict testicular sperm retrieval in patients with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2002; 17:971–976.
6. Von Eckardstein S, Simoni M, Bergmann M, Weinbauer FG, Gassner P, Schepers AG, et al. Serum inhibin B in combination with serum follicle stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:2496–2501.
7. Meachem SJ, Nieschlag E, Simoni M. Inhibin B in male reproduction: pathophysiology and clinical relevance. *Eur J Endocrinology* 2001; 145:561–571.
8. Ramaswamy S, Marshall GR, Pohl CR, Friedman RL, Plant TM. Inhibitory and stimulatory regulation of testicular Inhibin B secretion by Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone, respectively, in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 2003; 144:1175–1185.
9. 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; 25:747–806.
10. Andersson AM, Muller J, Skakkebaek NE. Different roles of prepubertal and postpubertal germ cells and sertoli cells in the regulation of serum inhibin B levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:4451–4458.
11. Young J, Couzinet B, Chanson P, Brailly S, Loumaye E, Schaison G. Effects of human recombinant luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in patients with acquired hypogonadotropic hypogonadism: study of Sertoli and Leydig cell secretions and interactions. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:3239–3244.
12. Kinniburgh D, Anderson RA. Differential patterns of Inhibin secretion in response to gonadotrophin stimulation in normal men. *Int J Androl* 2001; 24:95–101.
13. Tena-Sempere M, Kero J, Rannikko A, Yan W, Huthaniemi I. The pattern of inhibin/activin alpha- and beta (B)-subunit messenger ribonucleic acid expression in rat testis after selective Leydig cell destruction by ethylene dimethane sulfonate. *Endocrinology* 1999; 140:5761–5770.
14. Foresta C, Bettella A, Merico M, Garolla A, Ferlin A, Rossato M. Use of recombinant human follicle stimulating hormone in the treatment of male factor infertility. *Fertil Steril* 2002; 77:238–244.
15. Jensen TK, Andersson AM, Hjollund NH. Inhibin B as a serum marker of spermatogenesis: Correlation to differences in sperm concentration and follicle-stimulating hormone levels. A study of 349 Danish men. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:4059–4063.
16. Pierik FH, Vreeburg JT, Stijnen T, De Jong FH, Weber RF. Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:3110–3114.
17. Mahmoud AM, Comhaire FH, Depuydt CE. The clinical and biologic significance of serum inhibins in subfertile men. *Reprod Toxicol* 1998; 12:591–599.
18. Bohring C, Krause W. Serum levels of inhibin B in men with different causes of spermatogenic failure. *Andrologia* 1999; 31:137–141.
19. Anderson RA. Clinical studies: Inhibin in the adult male. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 180:109–116.
20. Liu YC, Cai ZM, Li XX, Li R, He R, Wu XH, et al. Predictive value of serum inhibin B levels as an indicator of the presence of testicular spermatozoa in nonobstructive azoospermia. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2006; 12:410–412.
21. Bailly M, Guthauser B, Bergere M, Wainer R, Lombroso R, Ville Y, et al. Effects of low concentrations of inhibin B on the outcomes of testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2003; 79:905–908.
22. Bohring C, Schroeder-Printzen I, Weidner W, Krause W. Serum levels of inhibin B and follicle-stimulating hormone may predict successful sperm retrieval in men with azoospermia who are undergoing testicular sperm extraction. *Fertil Steril* 2002; 78:1195–1198.
23. Brugo-Olmedo S, De Vincentiis S, Calamera JC, Urrutia F, Nodar F, Acosta AA. Serum inhibin B

- may be a reliable marker of the presence of testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2001; 76:1124-1129.
24. Von Eckardstein S, Simoni M, Bergmann M, Weinbauer GF, Gassner P, Schepers AG, et al. Serum Inhibin B in combination with serum Follicle-Stimulating Hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:2496-2501.
  25. Nagata Y, Fujita K, Banzai J, Kojima Y, Kasima K, Suzuki M, et al. Seminal plasma inhibin-B level is a useful predictor of the success of conventional testicular sperm extraction in patients with non-obstructive azoospermia. *J Obstet Gynaecol Res* 2005; 31:384-388.
  26. Balleca JL, Balasch J, Calafell JM, Alvarez R, Fabregues F, de Osaba MJM, et al. Serum inhibin B determination is predictive of successful testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2000; 15:1734-1738.
  27. Foresta C, Bettella A, Merico M, Garolla A, Ambrosini G, Ferlin A. Use of recombinant human follicle stimulating hormone in the treatment of male factor infertility. *Fertil Steril* 2002; 77:238-244.
  28. Foresta C, Bettella A, Moro E, Rossato M, Merico M, Garolla A, et al. Inhibin B plasma concentrations in infertile patients with DAZ gene deletions treated with FSH. *Eur J Endocrinol* 2002; 146:801-806.
  29. Foresta C, Bettella A, Merico M, Garolla A, Ferlin A, Rossato M. Treatment of male idiopathic infertility with recombinant human follicle-stimulating hormone: a prospective, controlled, randomized clinical study. *Fertil Steril* 2005; 84:654-661.
  30. Kliesch S, Behre HM, Hertle L, Bergmann M. Alteration of Sertoli cell differentiation in the presence of carcinoma in situ in human testes. *J Urol* 1998; 160:1894-1898.
  31. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main K. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 2001; 16:972-978.
  32. Rosenlund B, Kvist U, Ploen L, Lundh Rozell B, Sjoblom P, Hillensjo T. A comparison between open and percutaneous needle biopsies in men with azoospermia. *Hum Reprod* 1998; 13:1266-1271.
  33. Aridogan I, Bayazit AY, Yaman M, Ersoz C, Doran S. Comparison of fine-needle aspiration and open biopsy of testis in sperm retrieval and histopathologic diagnosis. *Andrologia* 2003; 35:121-125.
  34. Adamopoulos D, Kapolla N, Nicopoulou S, Pappa A, Koukkou E, Gregoriou A. Assessment of Sertoli cell functional reserve and its relationship to sperm parameters. *Int J Androl* 2003; 26:215-225.