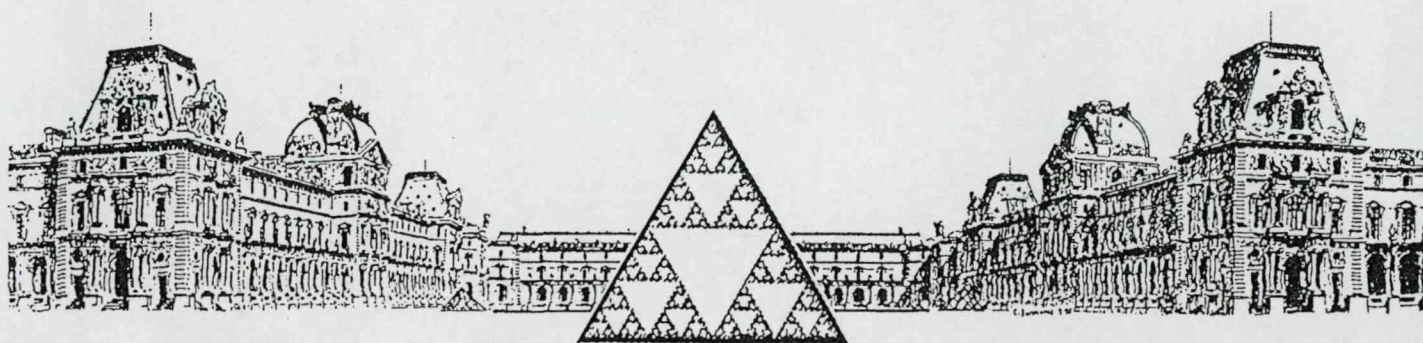


PAPER I

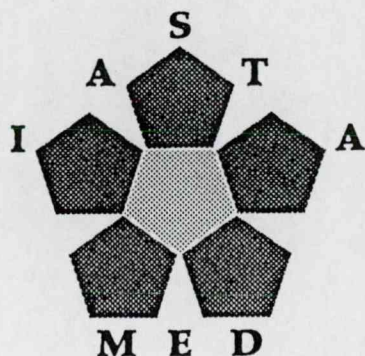
THE FIRST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON
ANDROLOGY BIOENGINEERING
AND
SEXUAL REHABILITATION

5-7 JULY, 1995

PARIS - LE LOUVRE - FRANCE



PROCEEDINGS
EDITED BY
J. TRITTO



AMBER

' 95

THE ROLE OF TESTICULAR BIOPSY IN MICROSURGICAL CORRECTION OF BILATERAL VARICOCELE

J. TRITTO-E. GIARGIA- C. CROZES-E. ERDAI-D. MORLIER
SERVICE OF URO-ANDROLOGY, TENON HOSPITAL
SERVICE OF UROLOGY, UNIT OF ANDROLOGY, SAINT-LOUIS HOSPITAL
PARIS-FRANCE

INTRODUCTION

New diagnostic, non-invasive, tools permit to detect infraclinical bilateral varicoceles and to confirm the degree of clinical bilateral varicoceles for staging and classification.

Echo-color Doppler and Duplex scan detect small to moderate refluxes and measure the arterial inflow.

Scintigraphic time-activity curves on both cords and testes show the specific dynamic pattern of varicocele. 3-D scintigraphic reconstructions of spermatic cords demonstrate the different anatomical compartments involved into the clinical varicocele, and the presence of intrascrotal communications that link dynamically both sides.

The introduction of microsurgical techniques in the correction of varicocele permits to select specifically the venous compartment sustaining the venous impairment (selective microdissection and ligation), sparing the autonomic nervous contingent of the cord and the lymphatic drainage of the testis.

The spermatic artery is systematically visualized on the microscope just to the bifurcation into testicular and epididymal arteries, measuring intra-operatively the basic flow with a Doppler micro-probe.

On these bases the scrotal exploration with bilateral testicular biopsy is systematically coupled to the microsurgical correction of bilateral varicoceles, in order to study the correlation between the pattern and the functional degree of varicocele and the quantitative analysis of testicular biopsy. Predictive parameters of recovery from oligo-asthenoteratospermia in patients with bilateral varicocele are obtained on a quantitative bases, as global indices of spermatogenesis in relation to the degree of clinical varicoceles.

CLINICAL GRADING OF VARICOCELE

The clinical classification of varicocele is based on four categories, relative to the inspection of the scrotum, to the palpation of the spermatic cord and to the Valsalva manœuvre in stand-up and supine positions.

The classification in grades I to IV is confirmed by the Echo-Color Doppler-Duplex Scan, realized bilaterally in supine position: the detection of infra-clinical varicocele (Grade I) in supine position is confirmed by the analysis of hemodynamic reflux, even if the Valsalva manœuvre in clinical evaluation is negative. On the other side the detection of the spermatic artery and the measure of the arterial inflow permit to establish the role of the arterial perfusion in front of the hypotrophic condition of the testis.

On 49 varicoceles submitted to microsurgical correction and bilateral testicular biopsy, 37 are found to be bilateral (75.5%), confirmed by Echo-Color Doppler. The degree in bilateral varicocele is similar in a small number of cases (6), corresponding at 17.5%. The great majority presents a different degree on both sides (82.7%), with a very large prevalence of high degree on the left side in front of the right side. The great prevalence of the degree III-

IV is localized on the left side and the low degree(I-II)clinical classes are localized on the right side.

SCINTIGRAPHIC CLASSIFICATION

All the bilateral varicoceles(37) are submitted to the pre-operative scintigraphic evaluations.

Scintigraphic time-activity curves are obtained in both cords and testes,respectively.The degree of accumulation of the radioisotope is evaluated and compared on both sides as relative differences of activities.

The patterns of time-dependent curves are similar on both cords and correspond to the classical curves described by Comhaire,whereas the degree of activity depends on the degree of varicocele.

On the contrary the patterns of the time-dependent curves of both testes do not demonstrate any correlation with the clinical degree of varicocele.

The sequential analysis of the different phases of the accumulation of the radioisotope on the cords permits to detect,with complex procedures of high resolution imaging,the presence of intrascrotal communications that link dynamically both sides.

The application of Tomoscintigraphic reconstruction procedures on the spermatic cords permits to confirm the presence of these intrascrotal vessels between both sides,and to analyse the configuration of the anterior and posterior compartments of bilateral varicoceles,carrying out the indication for a more selective dissection during the microsurgical correction.

On 35 bilateral varicoceles submitted to the scintigraphic pre-operative evaluation,34 show intrascrotal communications that seem to sustain the hemodynamic coupling between the time-activity curves of both sides,even if the clinical degree of varicocele is different on both sides in 28/34.

TESTICULAR BIOPSY

35/37 bilateral varicoceles are submitted,in the same time of the microsurgical correction,to the bilateral testicular biopsy.

The testicular biopsy is realized using a microsurgical protocol,the SINB procedure,in which 4 parameters are evaluated: the Sector of the biopsy,that is the quadrant in which the sample will be taken(quadrants supero-lateral,infero-lateral,supero-medial,infero-medial);the Incision of the albuginea of the testis(transversal,oblique);the Number of samples taken from the specific zone;the Bleeding under the albugineal incision is evaluated from 0 to 3(defined as 0=no bleeding;1=interstitial;2=venous;3=arterial).

For each incision 3 micro-samples are obtained for histo-pathological,cytological and computer-assisted analyses.

On 6 cases the bilateral biopsy is realized on corresponding quadrants,each for each testis. On 28 cases the bilateral biopsy is realized according the protocol of the odd-couple for each testis:two-opposite quadrants are selected for each testis and samples are taken from corresponding sectors on both testes.The selection of the odd-couples is randomized in order to obtain a representative number of cases for each couple.

TESTICULAR BIOPSY INDICES

Starting from the histo-pathological descriptions and the quantitative distributions of basic lesions in the testis,through the application of the quantitative analyses of the spermatogenetic process,with a computer-assisted evaluation of the classical score,a series of Global indices is introduced in order to obtain a global evaluation of the Fertility Power of the

testis in terms of percentage of spermatogenesis, relative to the clinical degree of bilateral varicocele.

1. M N S, M N S T

The Mean Number of Spermatids per tubule is obtained during the quantitative analysis of the bioptic sample for each biopsy (M N S); then the global mean number of spermatids per tubule in the odd-couple for each testis (M N S T) is calculated; this represents the relative potential of the pool of spermatids available for the passage into the epididymis.

The distribution of the mean in terms of percentage of spermatids per tubule in the odd-couple (M N S T) is correlated to the degree of clinical varicocele: a large distribution and variability of the M N S T is found in the low and high degrees of varicoceles, respectively, even if in the low degrees' varicoceles the distribution of the means is representative of the right testes and in the high degrees' varicoceles is prevalently representative of the left testes.

2. D M N S

The quantitative differences between the percentage of spermatids per tubule (M N S) in each odd-couple is calculated (D M N S): this represents the degree of perturbation of spermatogenesis between the quadrants and it is correlated to the degree of varicocele: at low-degrees' varicoceles the distribution and the variability of the differences are large, whereas at high-degrees' varicoceles the distribution is narrow and the differences' values are low. The distribution of the D M N S at low degrees' is representative of the right testes, while at high degrees' it is representative of the left testes.

3. M, MD

The mean (M) of the whole set of M N S T values is calculated and compared to the Mean Difference (M D) of the whole set of D M N S values for each degree of varicocele (Fig.1).

The comparison between the global mean percentage (M) and the global gradient (M D) shows that there is a strong correlation between both in relation to the degree of varicocele: at low degrees' there is a high percentage of spermatids per tubule, but there is also a high level of perturbation of spermatogenesis in terms of difference between the odd samples; at high-degrees', on the contrary, a low level of the spermatogenetic gradient expresses the low percentage of spermatids per tubule, well-correlated to the high incidence of fibrotic involution of testes.

4. TESTICULAR INDEX (T I)

....GLOBAL INDEX (G I)

The introduction of the relative ratio between the mean percentage number of spermatids per tubule of each testis (M N S T) and the difference between the percentage number of spermatids per tubule in the odd-couple of the testis (D M N S), permits to obtain a special Index (T I) characteristic of each testis with its varicocele.

A low T I indicates a large gradient in each testis, independent of the mean value of percentage of spermatids per tubule. A high T I , on the contrary, demonstrates a high stability of the percentage of spermatids into the testis.

The difference between the bilateral testicular indices (Indices Variation) represents the Global Index, that describes the potential status of spermatogenetic balance of both testes as a whole and identifies the position

of the patient in the exponential distribution of the varicoceles' population (Fig. 2).

When all the global indices are distributed in a numerical order, a characteristic exponential distribution is obtained for the population of bilateral varicoceles; this means that the pathological events linked to the bilateral varicocele involving both testes, relative to the spermatogenetic process, are defined according to specific biological rules of evolution.

Two classes of patients with bilateral varicoceles are identified through the application of Global index distribution relative to the bioptic analyses (Fig. 3):

In Class A the Global Index is high: there is an inverse correspondence between the T I on one side and the degree of varicocele and the D M N S on the other side.

In Class B the Global Index is low: there is a direct correspondence between the T I and the degree of varicocele and an inverse correspondence between the T I and the D M N S .

DISCUSSION

The introduction of bilateral testicular biopsies during the microsurgical correction of bilateral varicocele permits to obtain specific indices representative of the spermatogenetic status in patients with infertility problems.

The Indices are obtained starting from the quantitative analyses of bioptic samples, taken according to the odd-couple procedure. The selection of odd quadrants for each testis permits to analyse the relative difference of spermatogenetic process perturbed by the hemodynamic effect of the varicocele.

The relative difference in each testis (D M N S) is evaluated and compared to the degree of bilateral varicocele. A Global Index (G I) that describes the relative status of both testes in a whole is introduced as a parameter specific for each patient.

The analyses of the variations of the testicular indices (T I) for each couple of varicocele describe two patterns of clinical classes: Pattern A in which a high degree of varicoceles corresponds to a low index and a low degree of varicocele to a high T I ; Pattern B in which there is a correspondence between the degree of varicocele and the level of the T I .

On the other side the distribution of the global indices demonstrate that all the infertile patients with bilateral varicoceles belong to the same biological population from the histo-pathological point of view and identify specific temporal conditions of the bilateral pathology.

CONCLUSIONS

With the introduction of new sophisticated techniques of investigations (Echo-Color Doppler, Scintigraphy and Tomoscintigraphy), a relevant number of bilateral varicoceles is found.

The microsurgical correction permits to operate selectively the venous compartment involved into the varicocele, as well as the intrascrotal communications.

The introduction of bilateral testicular biopsy during the microsurgical correction permits to evaluate the functional status of each testis in terms of % of spermatids per tubule (M N S T) and in terms of gradient (mean difference) of spermatogenesis (D M N S) and to compare to the hemodynamic degree of varicocele.

The comparison between the testicular indices (T I) permits to obtain the Global Index for each patient, representative of the fertility potential relative to the varicoceles' degree.

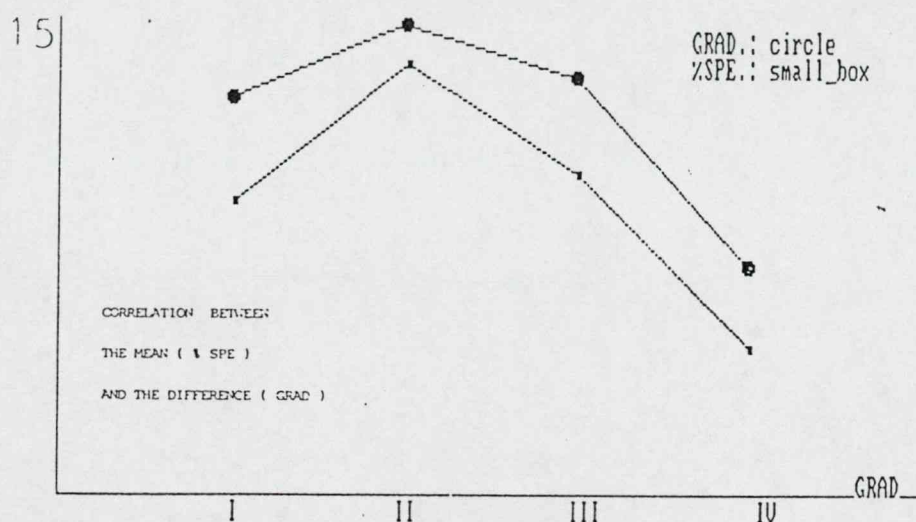
The high Global Index (Pattern A) represents a linear relationship between the clinical degree of varicocele and the functional status of the testis,describing the natural history of this pathology.

The low Global Index (Pattern B), on the contrary, describes a non-linear relationship between the degree of varicocele and the testicular index,indicating an impairment of the mechanisms that control the spermatic cord-testicular complex.

Based on these evaluations the patient is classified,belonging to a specific pattern (A and B) and located in a specific point of the exponential distribution curve of the patient pool.

GENERAL CONCLUSION

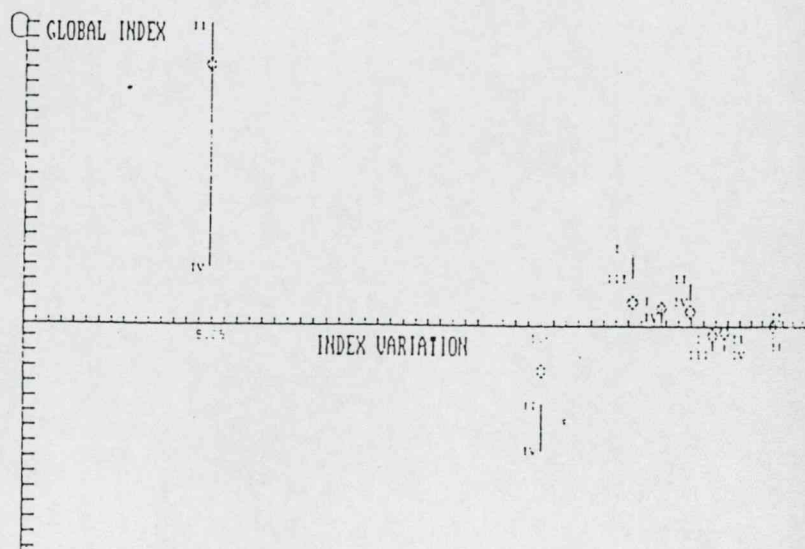
The systematic application of the bilateral biopsy in infertile patients with bilateral varicocele permits to evaluate exactly the functional status of both testes and the relative difference in between. The indices obtained from the bioptic analyses describe with quantitative and qualitative measures the process of spermatogenesis,permitting to grade the evolution of the pathology and to schedule a therapeutic program more adherent to the testicular function, independent of the degree of varicocele.



DIFFERENCE BETWEEN BOTH TESTES

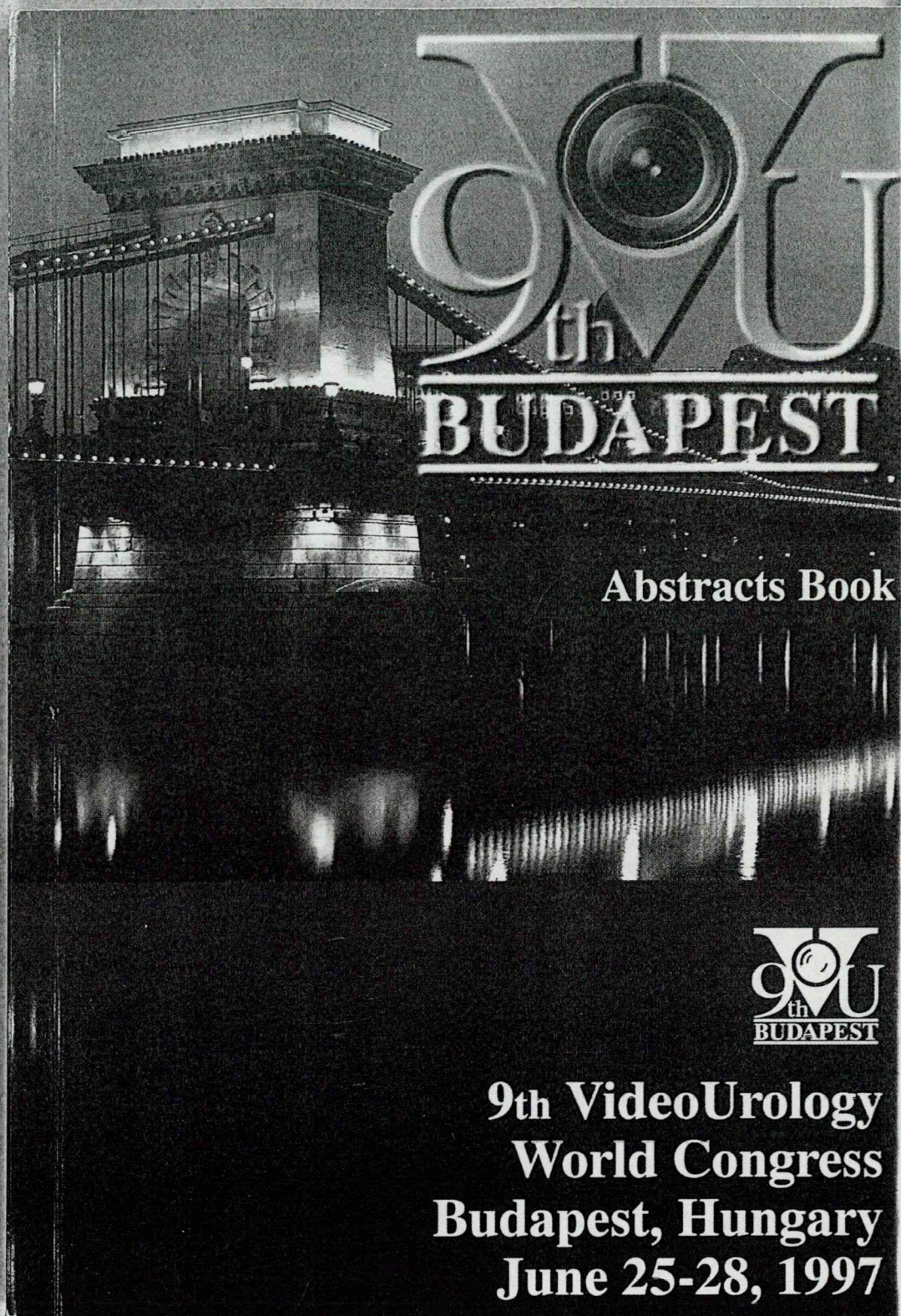
INDEX
MEAN % NUMBER OF SPERMATIDS PER TUBULE
IN THE ODD COUPLE

DIFFERENCE BETWEEN THE % NUMBER OF SPERMATIDS
PER TUBULE IN THE ODD COUPLE



NUMBER OF PATIENTS

PAPER II



9th BUDAPEST

Abstracts Book



**9th VideoUrology
World Congress
Budapest, Hungary
June 25-28, 1997**

PAPERS

Erdei E., Tritto J., M.O. North, Laki A., Arvis G., Rózsahegyi J., Karsza A.

The role of microsurgery on the treatment of varicocele

9th VideoUrology World Congress Abstract book B24, p:59, Budapest, 1997

Varicocele is found in approximately 15 per cent of the general male population. Different studies have demonstrated that it is associated with a progressive and duration-dependent decline in testicular function.

The association of varicocele and male infertility has been well documented. The correction of these lesion has been an important therapeutic procedure for many infertile men. The authors have been reported new technique for varicocele, including microsurgery. A subinguinal approach is presented for correction of varicoceles which combined microdissection of the spermatic cord and the external inguinal ring. This method had several advantages. The use of magnification enhances the ability of the surgeon to identify and preserve the testicular artery, the lymphatics, and obliterate all refluxing veins.

The incidence of complications can be reduced by employing microsurgical techniques.

Photos of live video surgery

Operating microscope in our operating room.

Subinguinal "mini" skin incision.

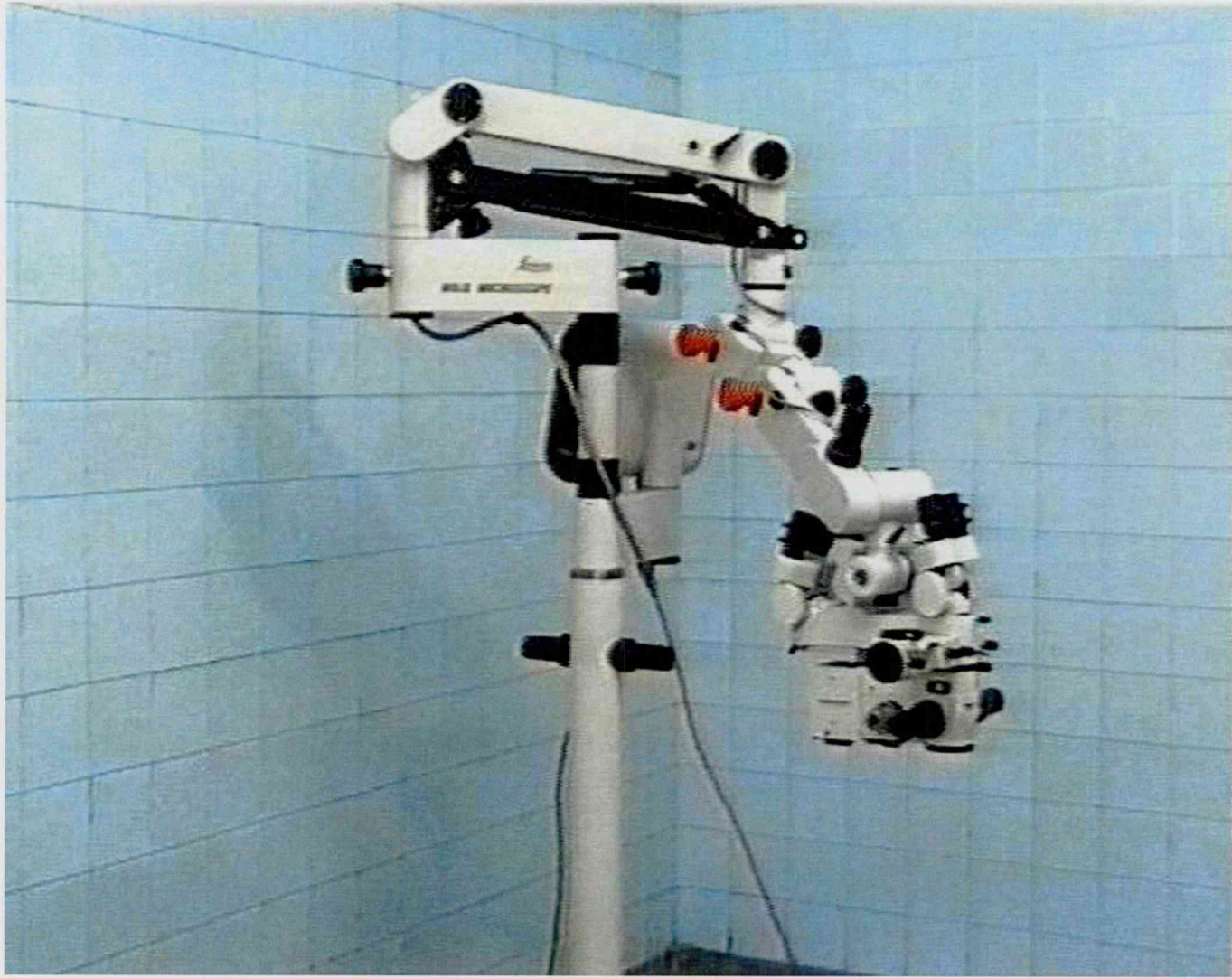
The incision is separated by small band retractors.

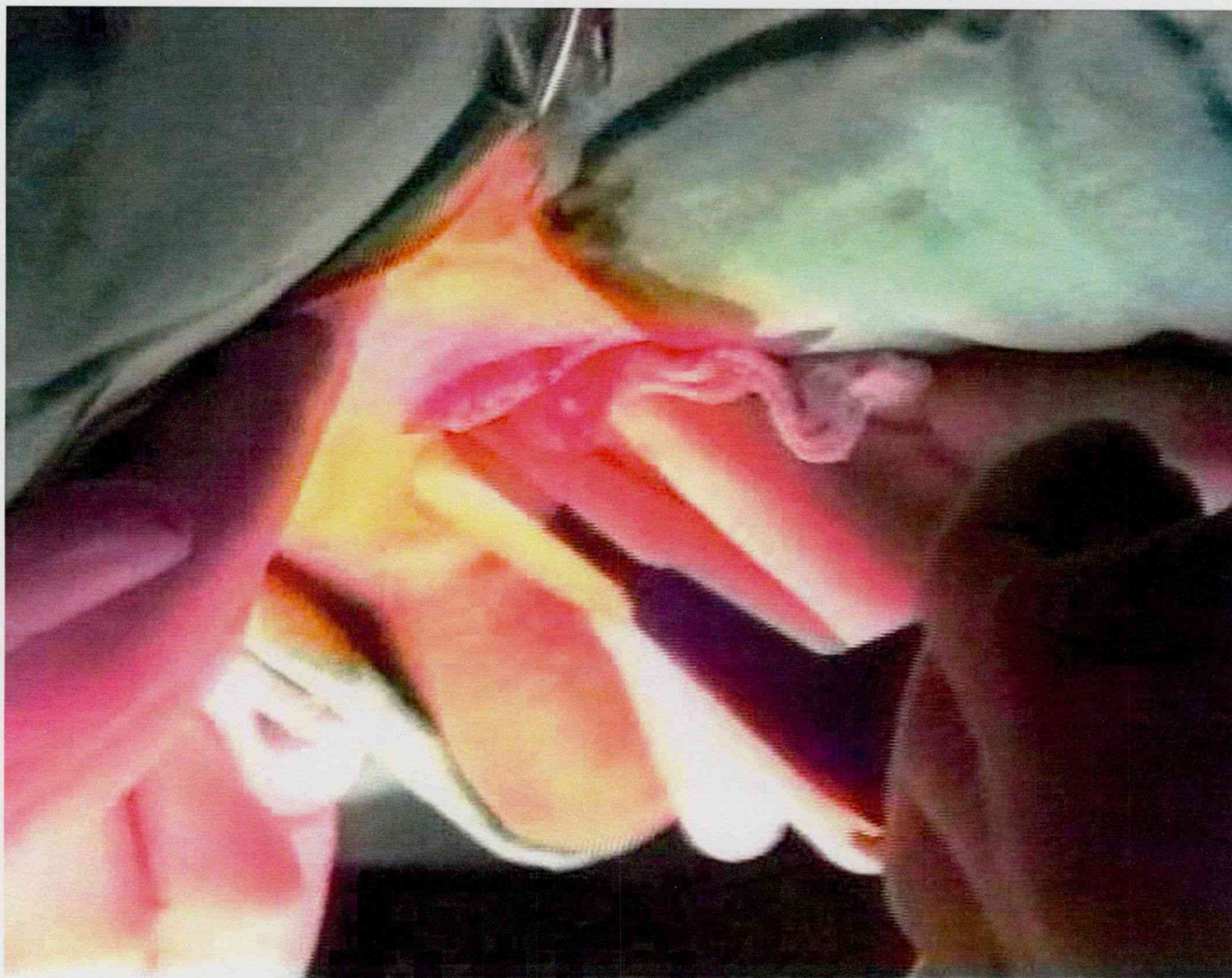
Self-retaining retractor is below the cord.

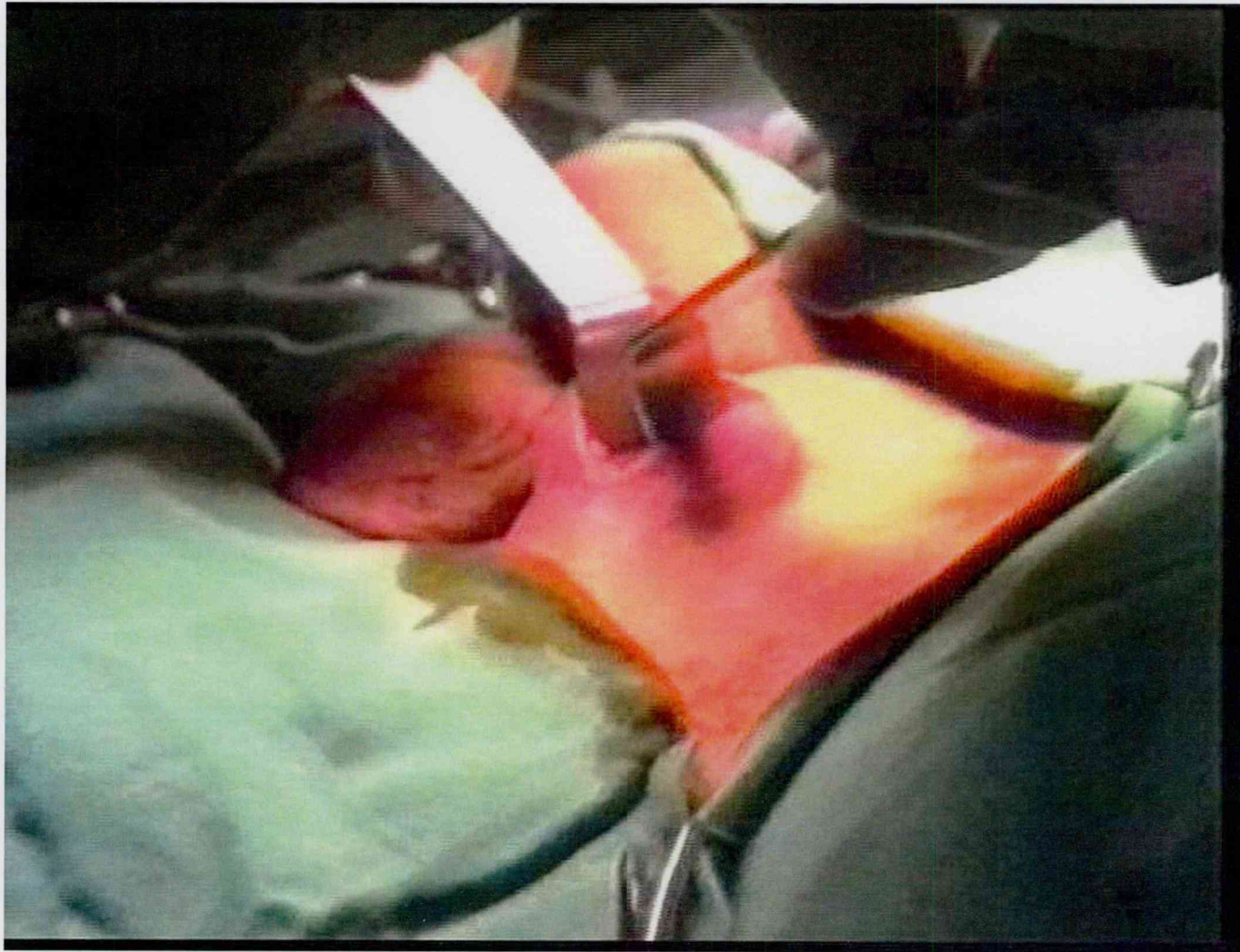
Dissection of veins with microinstrument.

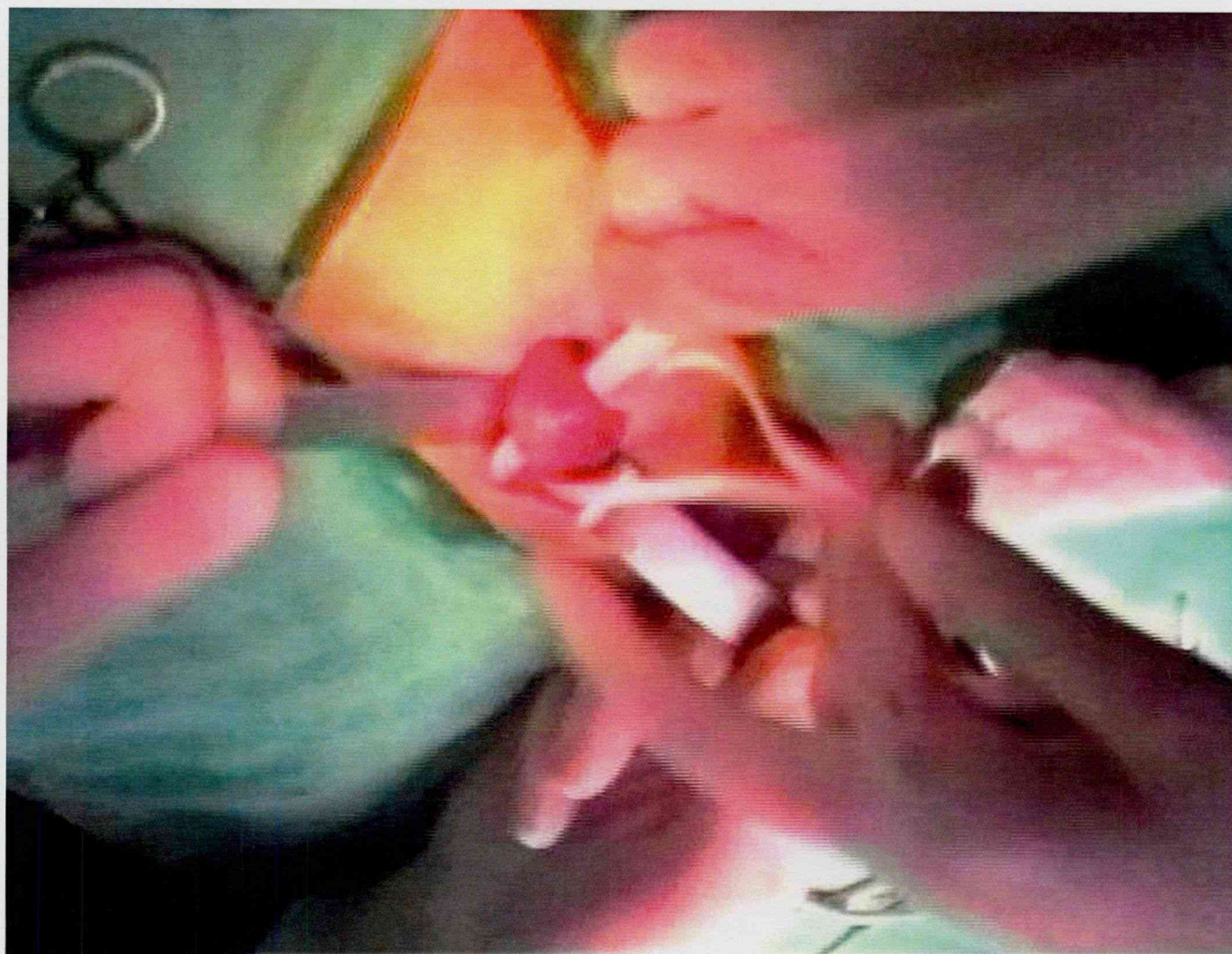
Transected veins after ligation.

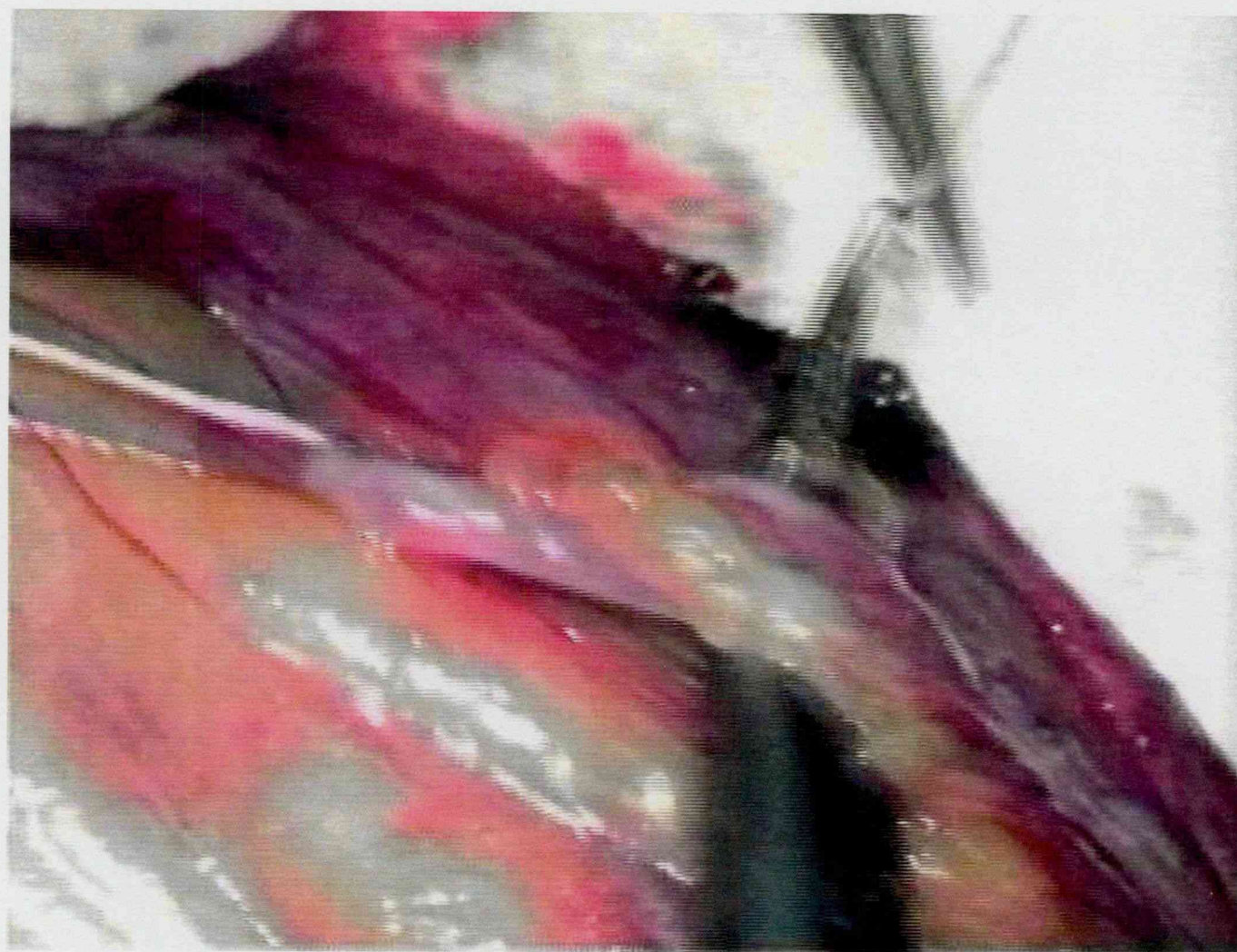


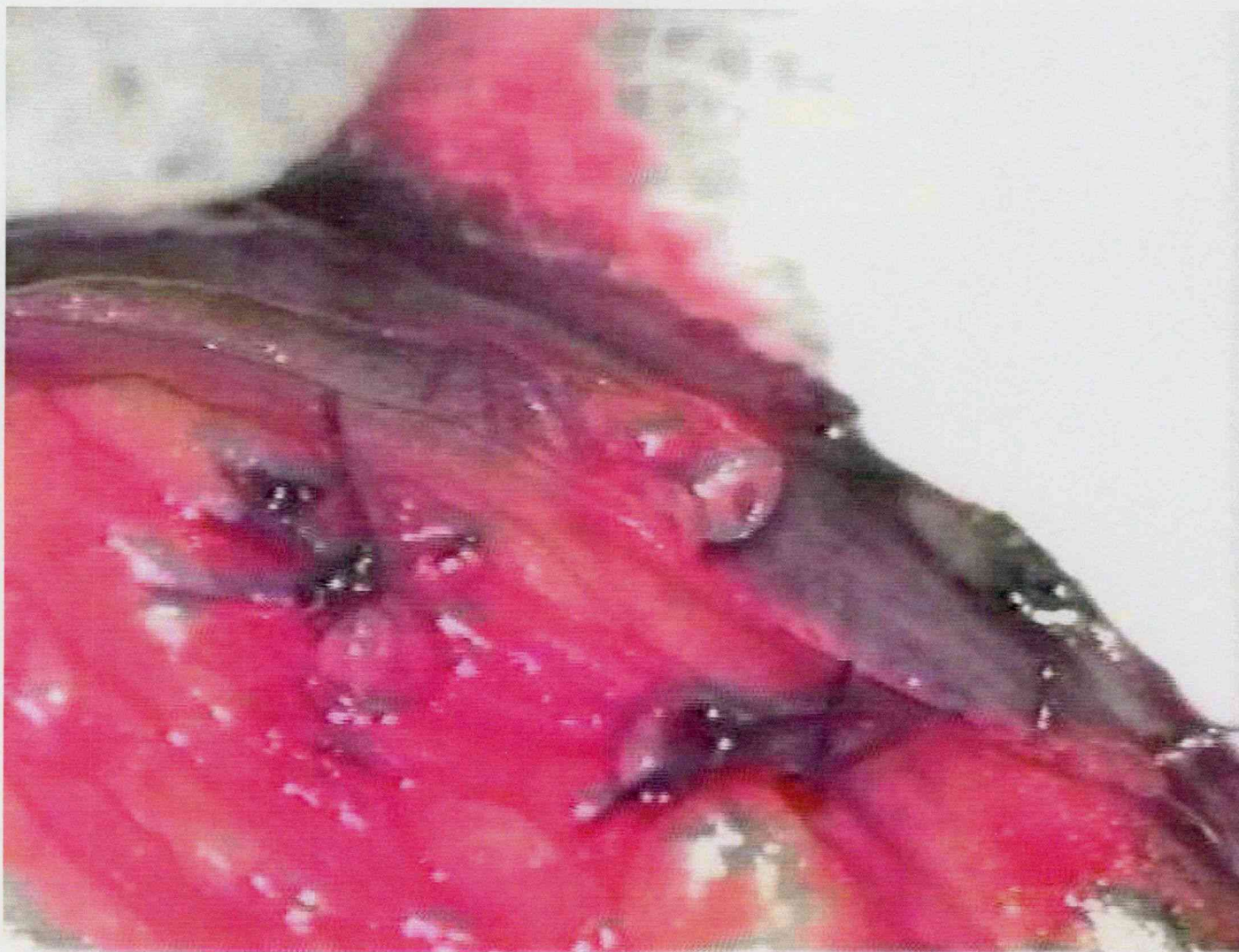












PAPER III

MONDUZZI EDITORE

1997

10th World Congress on
IN VITRO
FERTILIZATION AND
ASSISTED
REPRODUCTION

Vancouver, Canada
25-28 May 1997

Azoospermia, maturation arrest and bilateral varicocele: the role of the microsurgery

J. TRITTO, E. ERDEI * and M.-O. NORTH *

Service of Urology, Saint-Louis Hospital, Paris (F)

** Centre d'Andrologie de Paris, Tenon Hospital, Paris (F)*

10th World Congress on
IN VITRO
FERTILIZATION AND
ASSISTED
REPRODUCTION

Vancouver, Canada
24-28 May 1997

SUMMARY

Microsurgery of unilateral and bilateral varicocele represents a real improvement in male infertility. On a series of 127 bilateral varicoceles submitted to microsurgery, azoospermia is associated in 23% of cases.

The bilateral testicular biopsies carried out on the azoospermic patients show an incidence of ~10% of Maturation Arrest : 46.5% of cases express a global MA, 22% a partial and bilateral MA and 11% a partial and unilateral MA.

Meiotic disturbances, evaluated for each sample and for each testis in the azoospermic cases with or without MA, show an incidence of 28.5% of meiotic, pure toxic or pure genetic, abnormalities.

The application of microsurgery in azoospermia and bilateral varicocele results in a 55% of improvement on the spermogram : in obstructive subset, the positive response represents 33% versus the 80% response of the non-obstructive subset; on the Maturation Arrest the global response is 30% with a slight prevalence in the obstructive subset.

INTRODUCTION

The incidence of bilateral varicocele is astonishingly increasing in clinical evaluation, apparently due to the routinely utilization of colour-doppler ultrasound and dynamic scrotal scintigraphies (Tritto and Duyek, 1995) showing hemodynamically efficient intraseptal vascular communications between both cords.

The extensive application of scrotal exploration with multiple (odd-couple) testicular biopsies, respectively in bilateral varicocele and in azoospermia (Tritto, 1992) discovers a new clinical pattern in which the azoospermic patient presents the bilateral varicocele as a major male infertility factor.

The occurrence of the maturation arrest and the incidence of meiotic abnormalities are new implicit factors to establish the therapeutic strategy for ART.

PATIENTS, MATERIALS AND METHODS

127 patients with bilateral varicocele and severe male infertility factor are submitted to microsurgical correction with the sub-inguinal approach (Goldstein et al., 1992), associated to the bilateral testicular biopsy (the odd-couple procedure) with a mid-line septal scrotal incision (Tritto et al. 1995).

All the patients are pre-operatively evaluated with colour-doppler ultrasound to establish the degree of the varicocele (from I to IV); spermogram is used to set the distribution of the classes of infertility (from azoospermia to OATS : less than 5 M/ml).

Histomorphometry.

The bilateral multiple testicular biopsies according to the odd-couple procedure on specific and opposite quadrants of the testes are processed for computer-assisted histomorphometric analyses (Tritto, 1992). The CUE-2 color image analysis system on IBM computer work-station linked to the Olympus microscope is used to obtain histograms of the tubular profiles and of the interstitial spaces of the testis. For each bioptic sample, the quantitative spermatogenic parameters (Tritto et al. 1995) are calculated : *MNS* (Mean Number of Spermatids per tubule), *MNST* (Mean Number of Spermatid per Testis), *DMNS* (Difference between the Mean Number of Spermatids per tubules), *TI* (Testicular Index), and *GI* (Global Index).

Meiotic Study.

Selected patients with normal karyotype were submitted to meiotic studies. On all samples, air-dried meiotic preparations are done according to Guichaoua et al (1995). A minimum of 60 spermatocytes for sample (10 at each following stages : leptotene, zygotene, pachytene, diplotene, metaphase I and II) is examined with the aim to point out abnormal DNA coiling pattern, synaptic failure, chromosome breaking, sex vesicle (SV) abnormalities, autosome-SV association rate and chiasma pattern.

Meiotic abnormalities are classified in four groups : *I* - abnormal DNA coiling pattern type; *II* - asynaptic type : *IIA* - association between lack of SV formation and abnormal pairing in all stages (Hulten et al. 1974); *IIB* - complete asynapsis resulting in late-zygotene arrest (Navarro et al. 1980); *IIC* - meiotic impairment secondary to unfavourable physiological background (Speed and Chandley, 1990); *III* - desynaptic type (Templado et al, 1978); and *IV* - chiasmatic abnormalities (Navarro et al., 1980).

RESULTS

On 127 patients with bilateral varicocele and severe male infertility submitted to microsurgical correction and bilateral testicular biopsies, the incidence of azoospermic subset is about 29%, representing 63.5% of the whole azoospermic area ($<5\text{M/ml}$). High-level epididymal obstruction, evaluated with cross-cut epididymal biochemical markers analyses and zonal epididymal classification under operative microscope, represents 54.5% of the azoospermic population; on the other side the incidence of MA, detected on bioptic samples, represents 27%, equally randomly distributed between obstructive and non-obstructive patients.

The Maturation Arrest : Classes and Classification.

The Maturation Arrest (MA) is evaluated on quantitative bioptic score on the opposite polar testicular biopsy for each testis. Three classes are identified : *i* - global MA on both testes, representing 44.5%; *ii* - partial MA on both testes with symmetric or asymmetric distribution, representing 22 % respectively for each condition; *iii* - unilateral partial MA, representing 11%.

The Meiotic Analysis : Staging and Classification of Spermatocyte Maturation Arrest.

Meiotic abnormalities, are divided in genetic and toxic, permitting the staging of the bioptic samples and the meiotic cartographic representation of the testicular quadrants.

In the azoospermic population with bilateral varicocele 39.3% do not present any spermatocyte. On the other side, 32.1 % have a normal meiotic behaviour and 28.6% suffer from meiotic abnormalities.

In the last group, 21.5% present a pure meiotic pathology (in the present study : class I : 0; Class IIA = 7%; Class IIB = 7 %; Class III = 0; Class IV = 7 %). In class II, no spermatids or spermatozoa are present; in the other classes, a complete spermatogenesis is provided : some risk of meiotic gene mutation transmission (Hulten et al. 1974; Templado et al. 1986) and high risk of aneuploidy in class II and IV (Templado et al. 1986) are detected and described.

At the end, 7 % present pure toxic meiotic abnormalities (class IIC) as partial asynapsis, high rate of sex vesicle-autosome association (upper than 4.8 %), chromosome breaks.

The Microsurgical Correction of bilateral Varicocele in Azoospermia :

After bilateral varicocele microsurgical correction, a positive spermogram is obtained in 55% of the azoospermic group : in the obstructive subset the positive response represents 33% versus the 80% response of the non-obstructive subset.

On the Maturation Arrest the global response is 30% with a slight prevalence on the obstructive subset.

CONCLUDING REMARKS

The azoospermic patient with bilateral varicocele represents a new clinical entity with three specific patterns : obstructive, non-obstructive, with Maturation Arrest (obstructive and non-obstructive).

The systematic realization of multiple testicular biopsies with the computer-assisted histomorphometric and air-dried meiotic analyses permit to define the genetic and toxic impairments of the spermatogenic cycle in the seminiferous tubules in comparison to the hemodynamic and thermodynamic degradation of the gonads in bilateral varicocele (Dittmar and Tritto, 1993).

Computer-assisted classifications and scores on the testicular bioptic parameters are mandatory to realize clinical classes, to define the genetic risks on the meiotic impairment and to evaluate the real improvement on the major male infertility factor in the azoospermic patients.

The impressive effect of the microsurgical correction of bilateral varicocele on the severe male infertility factor, not only in non-obstructive patients, but also in the Maturation Arrest, underlines the key-role of the microcirculation and of the thermoregulation of the spermatogenetic process in the human testis and the possible implication for meiotic regulation.

REFERENCES

- DITTMAR A., TRITTO J. Continuous measurement of microcirculation and temperature in human testis using a thermal diffusion microsensor. *Proceedings IEEE EMBS*, 15, 992-993, 1993.
- GOLDSTEIN M. et al. Microsurgical inguinal varicocelectomy with delivery of the testis : an artery and lymphatic sparing technique. *J Urol*, 149, 1808-1811, 1992.
- GUICHAOUA M.R. et al. Meiotic techniques. In : VERMA, BABU Eds, *Chromosome Techniques*. New York, 1996.
- HULTEN M. et al. Abnormal synaptonemal complex in an oligo-chiasmatic man with spermatogenic arrest. *Hereditas*, 78, 105-116, 1974.
- NAVARRO J. et al. Meiotic chromosome studies and synaptonemal complex analyses by light and electron microscopy in 47 infertile or sterile males. *Hum Reprod* 1, 523-527, 1986.
- SPEED R.M., CHANDLEY A.C. Prophase of meiosis in human spermatocytes analysed by EM microspreading in infertile men and their controls and comparisons with human oocytes. *Hum Genet*, 84, 547-554, 1990.
- TEMPLADO C. et al. Four cases of low chiasma frequency diagnosed in semen. *Int J Androl*, 1, 153-161, 1978.
- TRITTO J. Computer assisted testicular biopsy multi level data base system model in male infertility. *Monduzzi Ed.*, Bologna, 753-762, 1992.
- TRITTO J. et al. The role of testicular biopsy in microsurgical correction of bilateral varicocele. *AMBER Proceedings* 274-278, 1995.
- TRITTO J., DUYCK F. Role of sequential dynamic scrotal scintigraphy and scrotal tomo-scintigraphy in the microsurgical correction of a varicocele. *AMBER Proceedings* 279, 1995.

PAPER IV

Cachiers d' Anthropologie et Biometrie Humaine

was published in 1997

**MESURE EN PER-OPÉRATOIRE ET EN TEMPS RÉEL
DE LA MICROCIRCULATION ET DE LA
TEMPÉRATURE DU TESTICULE PAR
MICROCAPTEUR IMPLANTABLE**

MESURE EN PER-OPÉRATEUR ET EN TEMPS RÉEL DE LA MICROCIRCULATION ET DE LA TEMPÉRATURE DU TESTICULE PAR MICROCAPTEUR IMPLANTABLE

G. DELHOMME⁽¹⁾, A. DITTMAR⁽¹⁾, J. TRITTO⁽²⁾, E. ERDEI⁽³⁾

(1) Microcapteurs et Microsystèmes Biomédicaux - INSA de Lyon - Bât 401 - CNRS LPM
20, avenue Einstein - 69621 Villeurbanne Cedex - France
Tél : 33 (0)4 72 43 89 86 - Fax : 33 (0)4 72 43 89 87 - Email : dittmar@univ-lyon1.fr

(2) Service d'Andrologie, Hôpital Tenon, 4, rue de Chine, 75020 Paris, France

(3) Université des Sciences de la Santé "Haynal Imre", Clinique d'Urologie, H-1135 Budapest,
Szabolcs u. 33

RÉSUMÉ :

La thermorégulation du testicule est un système complexe, organisée à plusieurs niveaux: les échanges à contre courant localisés dans le cordon spermatique, la dissipation de la chaleur par le scrotum et l'organisation microvasculaire du testicule.

L'altération des mécanismes de thermorégulation des testicules est un facteur important de l'infertilité masculine dans les pathologie tel que la varicocèle ou le cryptorchidisme.

La conductivité thermique tissulaire, lié aux échanges thermiques, est un paramètre de choix tant pour l'évaluation de l'atteinte microcirculatoire due à la varicocèle que pour l'étude de la réactivité tissulaire ou pour l'évaluation des résultats de la chirurgie corrective.

Les résultats des mesures, réalisées au cours de la microchirurgie corrective d'une varicocèle, par microcapteurs de mesure de la conductivité thermique et de la température, montrent l'intérêt de cette méthodologie pour l'étude et la compréhension des dysfonctionnement de la thermorégulation testiculaire.

Cette biométrie temps réel offre au chirurgien la possibilité d'optimiser son geste à partir de données objectives qui ne lui seraient pas perceptibles autrement.

I - INTRODUCTION

La biométrie en temps réel durant les opérations offre au chirurgien la possibilité d'optimiser son geste à partir de données objectives qui ne lui seraient pas perceptibles autrement.

Chez l'homme, comme chez la plupart des mammifères, la température des testicules est plus basse que leur température centrale. La température testiculaire normale chez l'homme se situe entre 33 et 34 °C pour une température centrale de 37 °C.

Soumis à "Cahiers d'Anthropologie et Biométrie Humaine"
le 19 février 1997

Les mécanismes de thermorégulation qui permettent de maintenir les testicules à cette faible valeur de température, nécessaire à la spermatogenèse, sont complexes et organisés à plusieurs niveaux :

- 1) les échanges à contre courant localisés dans le cordon spermatique, où l'artère est entourée par le réseau veineux du plexus pampiniforme,
- 2) la dissipation de la chaleur par le scrotum, modulée par les variations de sa surface d'échanges,
- 3) l'organisation microvasculaire du testicule permet de maintenir sensiblement homogène la température de l'ensemble du testicule.

L'altération des mécanismes de thermorégulation des testicules est un facteur important de l'infertilité masculine dans les pathologie tel que la varicocèle, le cryptorchidisme et le "testicule chaud", [11].

La microchirurgie corrective de la déficience de thermorégulation testiculaire dans la varicocèle unilatérale ou bilatérale est une technique nouvelle qui agit par la suppression des échanges à contre courant dans le cordon spermatique, permettant ainsi une récupération partielle de l'infertilité masculine à condition que le testicule maintienne ses mécanismes de microperfusion.

L'irrigation sanguine tissulaire est un paramètre de choix tant dans l'évaluation de l'atteinte testiculaire due à la varicocèle que dans l'évaluation des résultats de la chirurgie corrective.

II - BASES ANATOMO-FONCTIONNELLES DE LA THERMORÉGULATION ET DE LA MICROCIRCULATION TESTICULAIRE DE L'HOMME

Le complexe anatomo-fonctionnel cordon spermatique-testicule présente un système très sophistiqué de contrôle local de la thermorégulation et de la microcirculation testiculaires pour la maturation et le stockage du matériel génétique au cours de la spermatogenèse.

Les étude d'anatomie comparative et les descriptions anatomo-fonctionnelles de l'organisation du système cordon spermatique-testicule ont montré l'évolution et l'adaptation fonctionnelle du système, en fonction de l'organisation de la spermatogenèse.

La bilatéralité du système chez les mammifères introduit plusieurs niveaux de régulation, concernant chaque côté, ou l'ensemble, [8], [10].

Trois entités anatomo-fonctionnelles se sont développés au cours de la phylogenèse pour

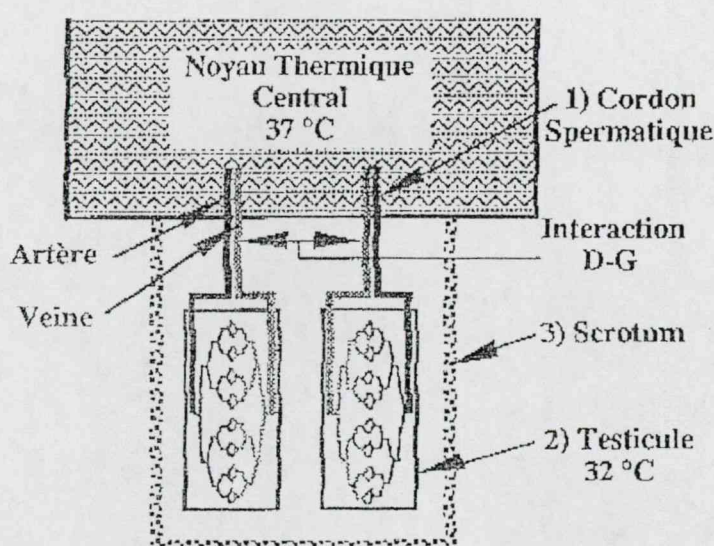


Fig. 1 : Les trois entités anatomof-onctionnelles de la thermorégulation testiculaire : le cordon spermatique, le testicule et le scrotum

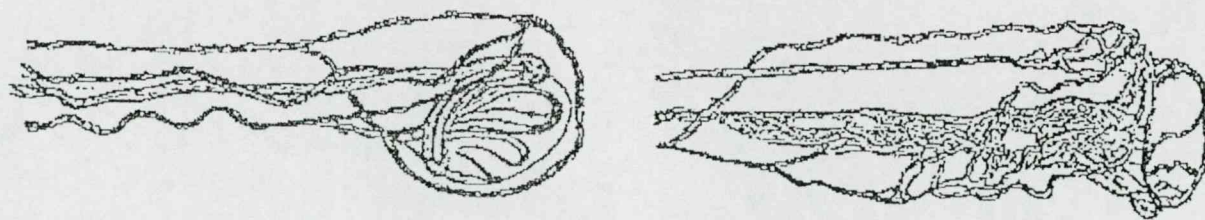


Fig. 2 : Organisation du système artériel et veineux du complexe cordon spermatique-testicule chez l'homme (à gauche le réseau artériel, à droite le réseau veineux)

assurer une thermorégulation et une microcirculation testiculaire adaptée à la maturation des spermatozoïdes, fig. 1.

1) Le cordon spermatique

L'ensemble de l'artère spermatique et du plexus veineux de drainage représente un véritable modèle de mécanisme d'échanges de chaleur à contre courant, [9].

Ce mécanisme est présent chez de nombreuses espèces, y compris les hauts mammifères et l'homme : sur le plan anatomo-fonctionnel, il est représenté par des réseaux spécifiques artériels et veineux qui assurent les échanges de chaleur à contre courant, fig. 2.

2) Le testicule

La disposition microvasculaire et tubulaire des testicules représente une véritable organisation fractale, fig. 2.

Les études comparatives montrent l'unicité de l'organisation fractale du testicule de l'homme. Cette organisation fractale assurent une distribution uniforme de la microcirculation et de la température dans le testicule, [7].

Les mécanismes d'échanges à contre courant et l'organisation fractale du testicule représentent les principaux systèmes de régulation du complexe cordon spermatique-testicule. Ils concernent chaque côté de façon indépendante.

3) Le scrotum

Le scrotum participe à la thermorégulation du testicule en faisant varier son isolation par rapport au milieu environnement.

L'unicité anatomique et fonctionnelle du scrotum, bien qu'étant divisé en deux compartiments contenant chacun un testicule, permet de moduler le thermostat local de façon à augmenter ou à abaisser la température testiculaire bilatéralement et donc d'obtenir un effet de masse, soit pour une distribution homogène de la chaleur, soit pour un système de refroidissement des testicules.

Le système scrotal, très bien développé chez plusieurs espèces, représente chez l'homme, un système adjuvant de modulation de la température testiculaire.

4) Les communicantes veineuses entre les deux cordons : un système complémentaire

Au niveau local existent deux systèmes de couplage qui permettent d'assurer le contrôle hémodynamique du complexes cordon spermatique-testicule pour la régulation de la température testiculaire.

a) Le premier mécanisme de couplage est représenté par des communicantes veineuses entre les deux cordons. Ce mécanisme est très peu utilisé dans les conditions normales, il rentre en jeu uniquement dans des conditions pathologiques de surcharge veineuse testiculaire, lorsque la spermatogenèse est altérée.

Dans ce cas l'ouverture des communicantes gauche-droites restaure une distribution veineuse homogène dans les deux cordons, ce qui permet d'uniformiser la distribution de la température et de synchroniser l'état fonctionnel des deux testicules. C'est le cas dans l'infertilité due à une varicocèle, qu'elle soit uni ou bilatérale.

Il existe plusieurs variations anatomo-fonctionnelles de communications veineuses entre les deux cordons, soit en conditions physiologiques, soit en conditions physiopathologiques comme dans la varicocèle bilatérale. Ces variations représentent de véritables modèles hémodynamiques dans système complexe de contrôle à plusieurs compartiments et à plusieurs niveaux hiérarchiques.

Sur les bases physiopathologiques complexes détectées par imagerie médicale dynamique, des modèles mathématiques de simulation et des modèles hémodynamiques tridimensionnels ont été développés pour montrer la logique de l'organisation du complexe cordon spermatique-testicule, en particulier le mécanisme d'échanges de chaleur à contre courant et le mécanisme d'organisation fractale testiculaire.

L'étude des mécanismes de contrôle de la thermorégulation et de la microcirculation testiculaire permettent d'une part de mieux comprendre les mécanismes de régulation et de stockage du matériel génétique dans le testicule et d'autre part de proposer des solutions thérapeutiques permettent d'agir sur les différents compartiments, à différents niveaux et de corriger les défauts hémodynamiques ou intrinsèques des testicules.

L'application des techniques mini invasives du génie biomédical a permis de vérifier et de confirmer ces mécanisme de régulation, au cours d'opérations microchirurgicales et de simulations pharmacologiques in vivo.

Les études cliniques d'applications des système de refroidissement scrotal ont permis d'autre part de quantifier l'effet de la température scrotale sur la modulation de la spermatogenèse dans certaines conditions d'infertilité de l'homme.

III - IRRIGATION SANGUINE TISSULAIRE

La vascularisation comprends deux principaux composants fonctionnels :

1) les transporteurs composé de veines et veinules, d'artères et d'artérioles dont la principale fonction est de transporter les nutriments (O_2 , glucose, ...) et les substances produites par le métabolisme tissulaire (CO_2 , Chaleur, ...),

2) les échangeurs, essentiellement composés de vaisseaux capillaires, sous le contrôle du système nerveux central par l'intermédiaire des sphincters précapillaires.

La densité et le nombres de vaisseaux capillaires sont très important (la distance entre deux capillaires est d'environ 30 μm). Leur surface d'échanges par rapport à leur volume est élevée. Les vaisseaux capillaires irriguant chaque partie des organes assurent également l'homogénéisation des échanges, que se soit de nutriments ou de chaleur.

Dans un vaisseau unique, le débit sanguin est évalué simplement, il est égale à la section du vaisseau par la vitesse du sang qui la traverse, exprimé en ml/min.

A l'opposé, la notion d'irrigation sanguine tissulaire (microcirculation) est plus complexe et parfois confuse. Le concept de débit sanguin spécifique (débit sanguin par unité de poids ou de volume de tissu) est utilisé couramment mais présente des lacunes. En effet, deux débit spécifiques correspondront à une réalité totalement différente si le nombre de vaisseaux capillaires perfusés est différents car la surface d'échange n'est pas pris en compte dans cette unité.

La notion d'échanges est un concept beaucoup plus approprié pour rendre compte de l'activité du réseau microcirculatoire dont la fonction est précisément les échanges. La conductivité thermique tissulaire permet de rendre compte de ses échanges.

IV - CONDUCTIVITÉ THERMIQUE TISSULAIRE

La diffusion de la chaleur dans un tissu vivant permet la quantification des possibilités d'échanges du réseau microcirculatoire. Cette quantification est réalisée par la mesure de la conductivité thermique tissulaire.

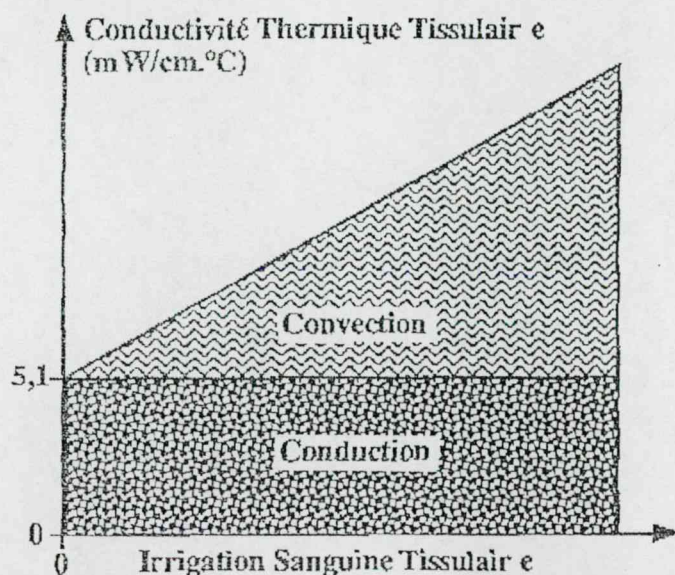


Fig.3 : La conductivité thermique tissulaire est le résultat du transport de la chaleur par conduction et par convection

La chaleur est un marqueur "naturel" des échanges tissulaires :

Ce marqueur, non toxique, peut être utilisé indéfiniment, il diffuse dans tous les tissus sans phénomène de recyclage. Sa production est peu coûteuse et sans problème d'approvisionnement. La chaleur est générée localement par des dispositifs très variés suivant les conditions locales d'application et le volume à explorer, de quelques fractions de mm^3 à tout l'organisme. La quantité de marqueur délivré est contrôlable et modulable en continu et à tout instant.

A l'opposé, les marqueurs radioactifs tel que le Xe^{133} et les colorants ne présentent pas tous ces avantages.

La conductivité thermique tissulaire est le résultat de deux modes de transport de la chaleur, fig. 3 :

1) Le transport de la chaleur par conduction, c'est-à-dire, sans déplacement de matière, dépend de la proportion de lipide, de protéine et d'eau contenue dans le tissu. Du point de vue thermique, un tissu biologique est un milieu à deux composants comprenant d'une part un matériau de faible valeur de conductivité thermique ($1,75 \text{ mW/cm.}^\circ\text{C}$) composé de lipide et de protéine et d'autre part mélangé avec de l'eau qui a une valeur de conductivité thermique environ trois fois plus élevée ($5,93 \text{ mW/cm.}^\circ\text{C}$). Sans perfusion tissulaire, la conductivité thermique tissulaire dépend principalement du contenu tissulaire en eau.

2) Le transport de la chaleur par convection, c'est-à-dire, par le réseau microcirculatoire, est d'autant plus élevé que l'irrigation sanguine tissulaire est importante.

La conductivité thermique tissulaire permet la détermination d'une échelle de valeurs quantitative de l'activité d'échanges tissulaires. Ainsi, un tissu graisseux ou nécrosé présente des valeurs faibles et stables de conductivité thermique qui sont le reflet d'une activité métabolique faible. Par contre, un tissu en cours d'activité métabolique normale présente des valeurs de conductivité thermique élevées et variables, signant les ajustements nécessaires à la thermorégulation et à l'activité métabolique.

La conductivité thermique tissulaire, liée aux échanges thermiques, doit être, à juste titre, considéré comme une grandeur physiologique, à part entière, d'évaluation de l'activité métabolique et microcirculatoire. Elle est très utile dans la biométrie tissulaire.



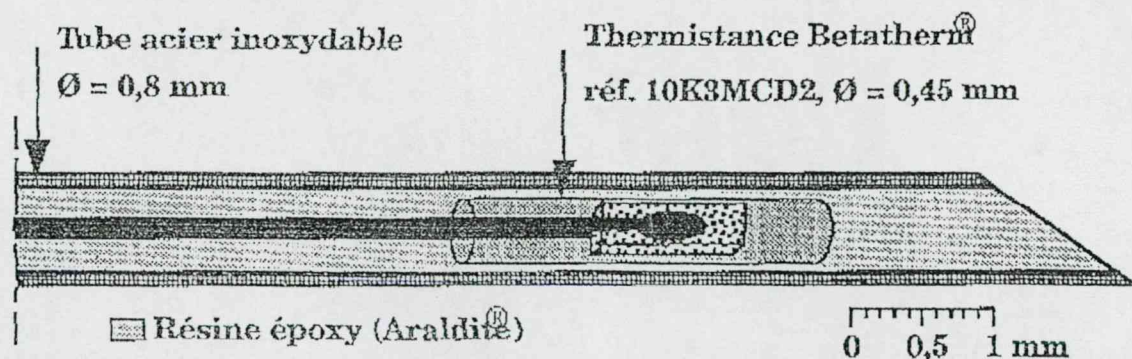


Fig. 4 : Microcapteur de mesure de l'irrigation sanguine tissulaire, de la conductivité thermique tissulaire et de la température.

V - MICROCAPTEUR À DIFFUSION THERMIQUE ET L'INSTRUMENTATION ASSOCIÉE

La conductivité thermique tissulaire est déterminée par une méthode de clairance thermique locale.

Le système de mesure fonctionne selon la méthode transitoire dans 2 régions du tissu au moyen de 2 microcapteurs à autochauffage et incrément constant de température, [2], [3], [5].

Les méthodes transitoires nécessitent qu'un seul point de mesure de température par le fait que les conditions initiales sont établies au point de chauffage. Ainsi, ces méthodes ne sont que peu affectées par un gradient de température au sein du milieu de mesure.

La procédure à incrément constant de température détermine la conductivité thermique tissulaire par l'analyse de la puissance dissipée par la sonde de mesure. Elle produit un champ thermique et un volume de mesure qui dépend faiblement des propriétés thermiques du milieu de mesure, comparé à la procédure à puissance constante.

Les microcapteurs à autochauffage ne nécessitent qu'une unique thermistance pour le chauffage et la mesure de la température. Cette méthode permet de construire des microcapteurs de dimension réduite donc faiblement invasifs.

Ce système de mesure fonctionne de manière cyclique avec deux périodes principales :

- 1) une période passive (24 s) pour la mesure de la température initiale du tissu,
- 2) une période de chauffage (6 s) pour la mesure de la conductivité thermique. Pendant cette période, la puissance électrique est dissipée dans la thermistance à un niveau suffisant pour maintenir sa température à un incrément constant au dessus de la température tissulaire initiale, mesurée par la même thermistance juste avant le chauffage.

Le modèle thermique sonde-milieu de mesure développé par H.F. Bowman est utilisé pour la détermination de la conductivité thermique tissulaire et l'irrigation sanguine tissulaire, [1].

Les microcapteurs implantables sont constitués d'une thermistance (Betatherm® 10K3MCD2) encapsulée avec de la résine époxy à l'extrémité d'une aiguille en acier inoxydable à paroi mince (0,8 mm de diamètre externe), Fig.4. L'élément de base de la thermistance utilisée est un petit et mince "chip" similaire à ceux utilisés dans les dispositifs à semi-conducteur. Cette thermistance est caractérisée par une haute stabilité (pas de changement après 1000 jours à 75 °C), un faible diamètre (0,45 mm) et une constante de temps faible (< 1 s).

Ces microcapteurs faiblement invasifs et stérilisables sont utilisables chez l'homme.

Chaque microcapteur est construit pour avoir des caractéristiques fonctionnelles similaires. La calibration finale est réalisée sur des modèles physiques qui ont une conductivité thermique connue et stable (vaseline et gel de polyacrylamide).

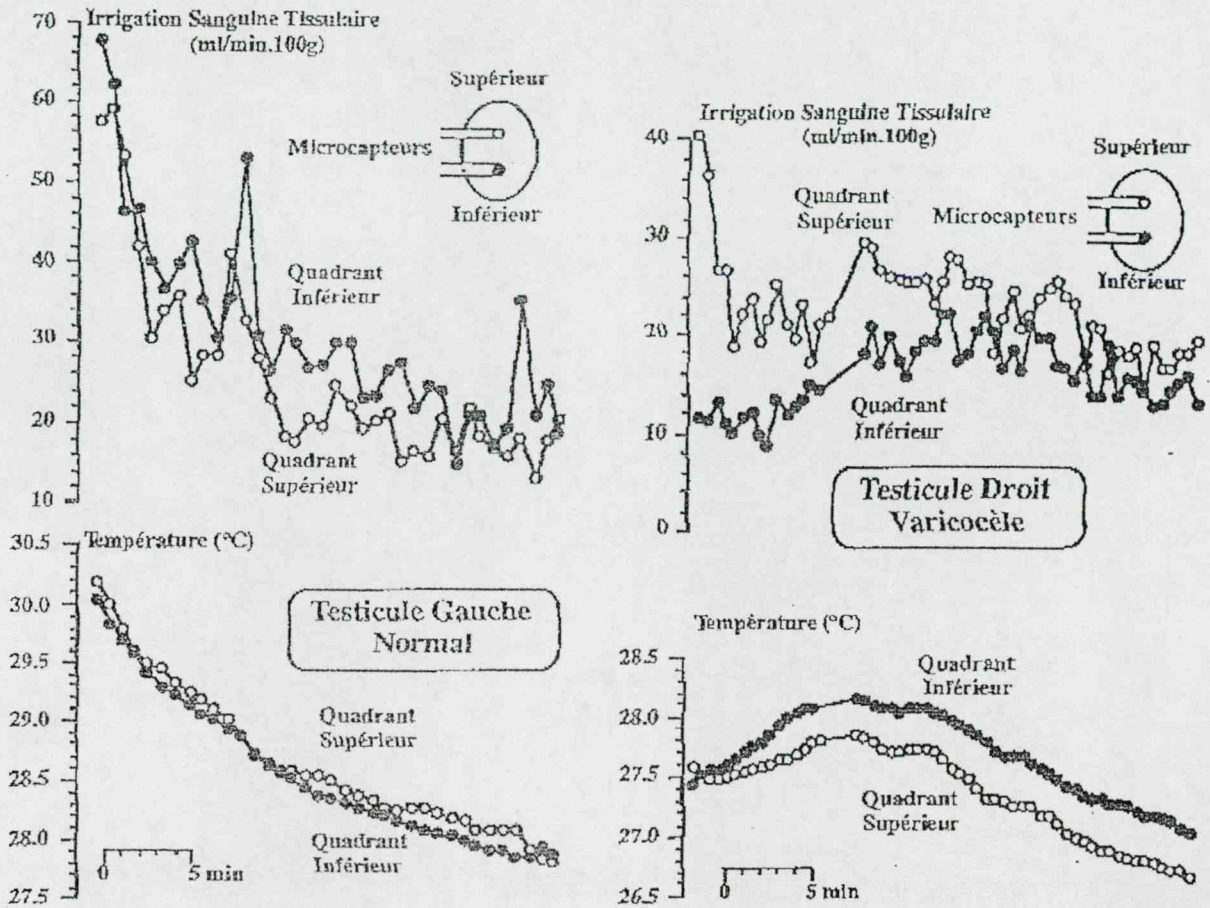


Fig. 5 : Mesure de l'irrigation sanguine tissulaire et de la température des deux testicules pendant la chirurgie correctrice de la varicocèle.

VI - RÉSULTATS

A - Varicocèle

Afin d'évaluer en temps réel l'irrigation sanguine tissulaire et la conductivité thermique tissulaire de testicules avec une déficience de thermorégulation, deux microcapteurs ont été implantés dans deux quadrants opposés de chaque testicule pendant la microchirurgie correctrice d'une varicocèle unilatérale, [4], [6]. Les mesures ont été d'abord réalisées dans le testicule gauche sans varicocèle, puis dans le testicule droit avec varicocèle.

Pour le testicule sans varicocèle, le dérours temporel de l'irrigation sanguine tissulaire et de la température présente une décroissance similaire. Le dérours temporel de ces deux paramètres pour le quadrant supérieur et inférieur est quasiment identique, fig. 5.

La relation entre l'irrigation sanguine tissulaire et la température est quasiment linéaire pour le testicule sans varicocèle, fig. 6.

Ces résultats montrent que pour le testicule sans varicocèle, l'irrigation sanguine tissulaire est homogène (valeur semblable dans les deux quadrants). Les possibilités d'évacuation de la chaleur de ce testicule, afin de maintenir sa température à une valeur optimum pour la spermatogenèse, sont opérationnelles.

Pour le testicule présentant une varicocèle, le dérours temporel de l'irrigation sanguine tissulaire et de la température sont indépendants. Les mesures montrent des différences importantes

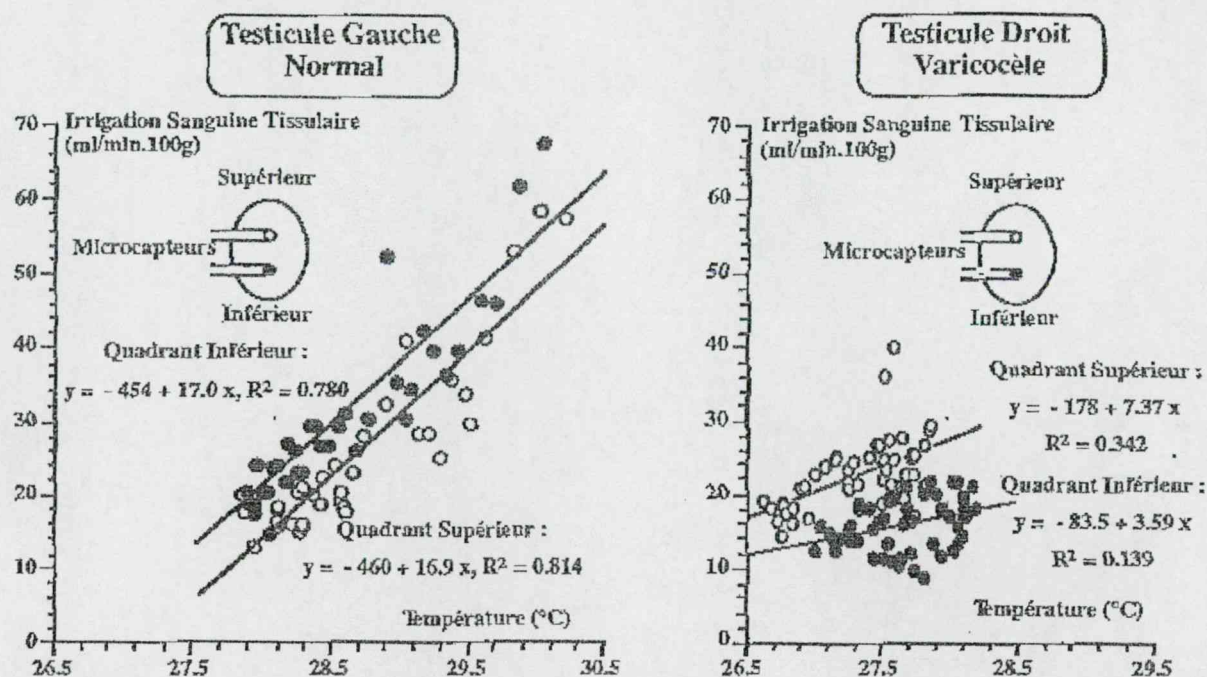


Fig. 6 : Relation entre l'irrigation sanguine tissulaire et la température du testicule.

entre celles du quadrant inférieur et celles du quadrant supérieur, pour les deux paramètres. L'irrigation sanguine tissulaire du quadrant inférieur est environ 50 % plus faible que celles du quadrant supérieur, fig. 5.

La relation entre l'irrigation sanguine tissulaire et la température n'est pas linéaire pour le testicule avec varicocèle, fig. 6. L'irrigation sanguine tissulaire est quasi indépendante de la température tissulaire.

Ces résultats montrent que l'irrigation sanguine tissulaire n'est pas homogène, mais présente des différences importantes en fonction de la localisation. Les possibilités d'évacuer la chaleur de ce testicule pour maintenir sa température à un niveau normal pour son fonctionnement sont très réduites.

Les biopsies réalisées dans les sites de mesures des microcapteurs, révèlent des différences histologiques correspondant à celle évaluées avec ces microcapteurs.

Les effets hémodynamiques de la varicocèle sur la perfusion tissulaire, l'architecture microscopique et la thermorégulation du testicule, sont partiellement responsables de l'évolution fibrotique du testicule. Cette évolution diminue les possibilités de restaurer la fonctionnalité du testicule.

B - Effet de l'injection d'un vasodilatateur

Afin d'évaluer en temps réel les effets du Fonzilane® sur l'irrigation sanguine tissulaire, la conductivité thermique tissulaire et la température tissulaire du testicule, le même microcapteur a été implanté dans chaque testicule pendant la microchirurgie corrective de la varicocèle, [6]. Les mesures ont été réalisées successivement dans le testicule gauche puis dans celui de droite.

Dans le testicule de gauche, aucun effet sur tous les paramètres mesurés n'a été relié à l'injection du Fonzilane, fig. 7. La faible valeur de la conductivité thermique tissulaire (5,4 mW/cm.°C) signe que le microcapteur est implanté dans un tissu fibreux ou dans un tissu faiblement perfusé. La non réponse de ce testicule à l'injection est due certainement à une atteinte tissulaire importante conséquent de la varicocèle.

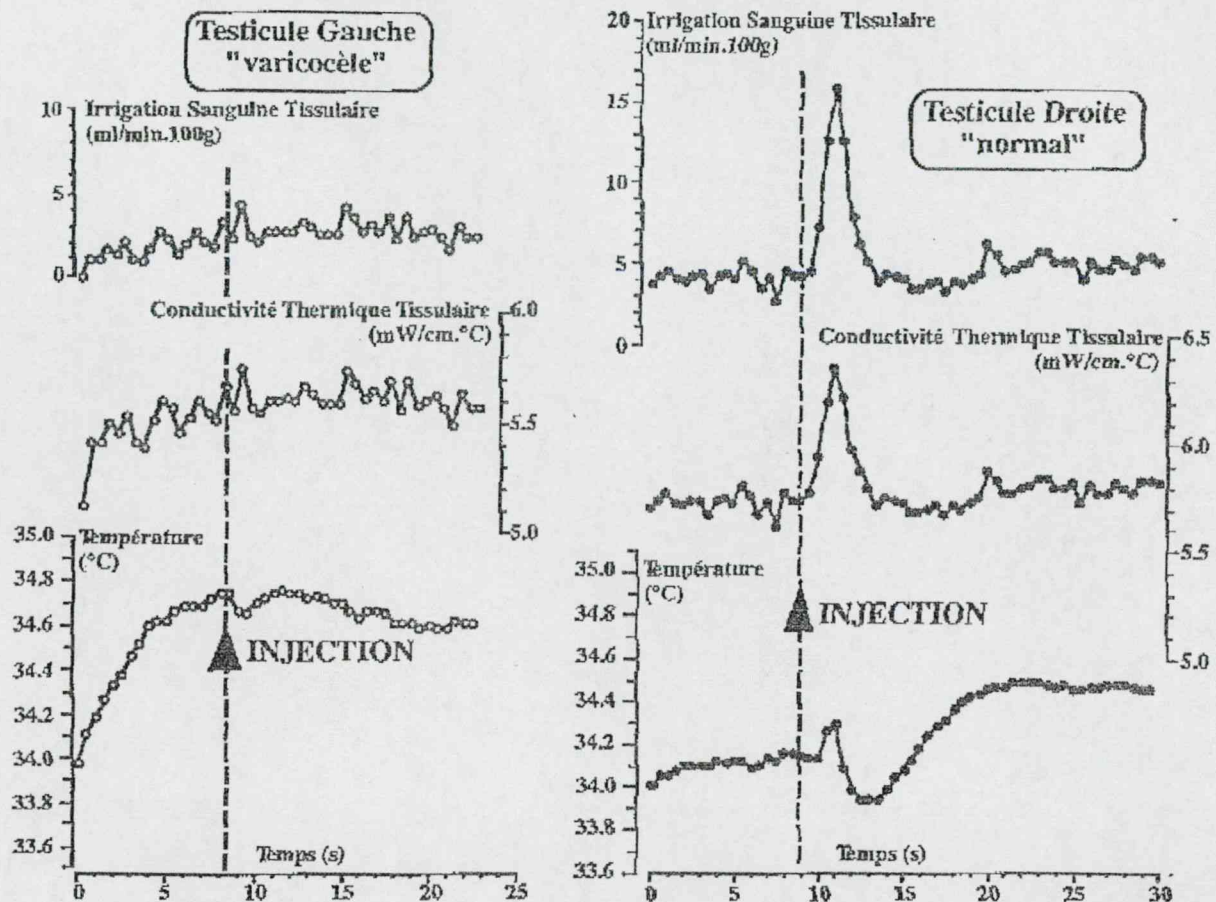


Fig. 7 : Effet de l'injection d'un vasodilatateur sur la microcirculation et la température du testicule.

Dans le testicule de droite, l'injection du Fonzilane induit une augmentation importante de l'irrigation sanguine tissulaire (+ 12 ml/min.100g) et une diminution de la température (- 0,4 °C), fig. 7. La diminution de la température du testicule est due à l'accroissement du "lavage" thermique par la microcirculation. L'activité microcirculatoire déterminée au moyen de la conductivité thermique tissulaire est similaire à celle exprimée en irrigation sanguine tissulaire (débit spécifique). Cependant, la conductivité thermique tissulaire, directement reliée aux échanges thermiques, est préférable pour évaluer le "lavage thermique" nécessaire pour le maintien de la température testiculaire au niveau optimum.

VII - CONCLUSION

La thermorégulation du testicule repose sur un ensemble de mécanismes complexe.

La microchirurgie corrective peut s'appuyer maintenant sur des données objectives, mesurées au cours d'opérations, pour mettre en évidence les dysfonctionnement des mécanismes thermovasculaire du testicule.

Le microcapteur et son instrumentation de mesure de la microcirculation et de la température sont bien adaptés pour une utilisation en salle d'opération. Les **mesures quantitatives, reproductibles** en continue et en temps réel, les comparaisons intra et inter sujet permettent l'étude des mécanismes et l'optimisation du traitement de la varicocèle.

La conductivité thermique tissulaire, directement reliée aux échanges thermiques, est un paramètre de choix pour l'étude du dysfonctionnement de la thermorégulation testiculaire, souvent responsable de l'infertilité masculine.

Ce microcapteur de mesure de la microcirculation et de la température tissulaire est la première partie opérationnelle du multimicrocapteur du projet "Micromed μ TAS".

Les paramètres mesurés par ce multimicrocapteur ont été sélectionnés pour avoir le maximum d'information sur l'activité métabolique tissulaire locale : microcirculation, conductivité thermique, température, PO₂, NO, lactate, pyruvate, caractérisation tissulaire optique et thermique.

La complémentarité des paramètres étudiés (thermiques, chimiques et optiques) permet des comparaisons et des corrélations, et par conséquent accroître la fiabilité des mesures.

Ces travaux mettent en jeu plusieurs disciplines étroitement imbriquées:

- la microchirurgie, la microtechnologie, la thermobiologie et la modélisation.

Cette approche est représentative d'une nouvelle approche de la chirurgie et de la microchirurgie s'appuyant sur une biométrie en temps réel.

RÉFÉRENCES

- [1] H. F. Bowman, "Estimation of tissue blood flow," in *"Heat transfer in medicine and biology : analysis and application"*, A. Shitzer and R. Eberhart, Eds, Plenum, N. Y., 1984, vol. 1, pp. 193-230.
- [2] G. Delhomme, A. Dittmar, W. H. Newman, H. F. Bowman, M. Jouvet, "Thermal diffusion probes for tissue blood flow measurements," *Sensors and Actuators*, vol. 6, pp. 87-90, 1992.
- [3] G. Delhomme, W.H. Newman, B. Roussel, M. Jouvet, H.F. Bowman, A. Dittmar, "Thermal diffusion probe and instrumentation system for tissue blood flow measurements : validation in phantoms and in vivo organs," *IEEE Trans. on BME*, vol 41, pp. 656-662, 1994.
- [4] G. Delhomme, A. Dittmar, G. Tritto, C. Martelet, D. Estève, C. Depaursinge, "Continuous Measurement Of Microcirculation and Temperature In Human Testis Using a Thermal Diffusion Microsensor," *First International Symposium on Andrology Bioengineering and Sexual Rehabilitation*, J. Tritto, Ed, Paris, France, 1995, pp. 81-85.
- [5] A. Dittmar, W. H. Newman, G. Delhomme and I. Delannoy, "Design and evaluation of a clinical perfusion monitor," in *"Heat and mass transfer in microcirculation of thermally significant vessels"*. ASME Winter Annual Meeting, United Engineering Centex, N. Y., 1986, vol. 61, pp. 17-22.
- [6] A. Dittmar, G. Delhomme, G. Tritto, W.H. Newman, H.F. Bowman, "Continuous Measurement of Testicular Tissue Blood Flow by a Micro-Probe Using Thermal Diffusion," *IEEE Trans. on BME*, vol 41, pp. 992-993, 1993.
- [7] J. Lefevre, "Fractal anatomy : a support for efficient physiological function," *First International Symposium on Andrology Bioengineering and Sexual Rehabilitation*, J. Tritto, Ed, Paris, France, 1995, pp. 176-180.
- [8] R. Mieusset, L. Bujan,, A. Mansat & F. Pontonnier, "Thermoregulation of testis and scrotum : significance for male infertility regulation," *First International Symposium on Andrology Bioengineering and Sexual Rehabilitation*, J. Tritto, Ed, Paris, France, 1995, pp. 191-196.
- [9] G. Tritto, "The multi-level compartmentation of the simulation models of the counter-current heat exchange (CCH) mechanism of the testis," in *"Advances in experimental medicine and biology : Temperature and environmental effects on the testis"*, A.W. Zorngiotti, Ed, Plenum, N. Y., 1991, vol. 286, pp. 137-151.
- [10] G. M.H. Waites, "Thermoregulation of testis and scrotum : significance for male infertility," *First International Symposium on Andrology Bioengineering and Sexual Rehabilitation*, J. Tritto, Ed, Paris, France, 1995, pp. 312-313.
- [11] A. W. Zorngiotti, "Hypothesis of explain subfertile semen," in *"Advances in experimental medicine and biology : Temperature and environmental effects on the testis"*, A.W. Zorngiotti, Ed, Plenum, N. Y., 1991, vol. 286, pp. 221-223.

PAPER V

THE JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM

84 (10): 3606-12, October, 1999

A high frequency of Y chromosome deletions in males with non-idiopathic infertility

C. KRAUSZ¹, L. QUINTANA-MURCI¹, S. BARBAUX¹, J.-P. SIFFROI², H. ROUBA³, D. DELAFONTAINE⁴, N. SOULEYREAU-THERVILLE¹, G. ARVIS⁵, J.M. ANTOINE⁶, E. ERDEI⁷, J.P. TAAR⁸, A. TAR⁹, E. JEANDIDIER¹⁰, G. PLESSIS¹¹, T. BOURGERON¹, J-P. DADOUNE², M. FELLOUS¹, K. McELREAVEY¹.

¹Immunogénétique Humaine, INSERM U276, Institut Pasteur, Paris, France.

²Laboratoire d'Histologie, Biologie de la Reproduction et Cytogenetique, Hôpital Tenon, Paris, France.

³Institut Pasteur, Casablanca, Morocco

⁴Médecine de la Reproduction, Paris, France.

⁵Service d'Urologie and ⁶Service de Gynecologie Obstetrique, Hôpital Tenon, Paris, France.

⁷Hajnal Imre Egészségtudományi Intézet, Budapest, Hungary

⁸Clinique de la Dhuys, Paris, France.

⁹Buda Children Hospital, Budapest, Hungary.

¹⁰Cytogénétique, CHU Mulhouse, France

¹¹CHU, Caen, France

Microdeletions of the long arm of the human Y chromosome are associated with spermatogenic failure and have been used to define three regions of Yq (AZFa, AZFb, and AZFc) that are recurrently deleted in infertile males¹⁻¹⁵. In a blind study we screened 131 infertile males (46 idiopathic and 85 non-idiopathic) for Y chromosome microdeletions. 19 % of idiopathic males, with an apparently normal 46,XY chromosome complement had microdeletions of either the AZFa, AZFb or AZFc regions. There was no strict correlation between the extent or location of the deletion and the phenotype. The AZFb deletions did not include the active *RBM* gene. Significantly, a high frequency of microdeletions (7%) was found in patients with known causes of infertility and a 46,XY chromosome complement. These included deletions of the AZFb and AZFc regions with no significant difference in the location or extent of the deletion compared with the former group. It is recommended that all males, with reduced or absence sperm counts, seeking assisted reproductive technologies be screened for deletions of the Y chromosome.

INTRODUCTION

An average of 10 % of couples encounter difficulties to procreate and consult infertility clinics¹⁶. In about half of cases, sperm production is defective, either quantitatively or qualitatively. Approximately one third to one half of these cases are classified as idiopathic¹⁷, but they may have an unidentified genetic anomaly. Microdeletions of Yq have been used to define three non-overlapping regions associated with a failure of spermatogenesis, termed AZFa, AZFb and AZFc⁴. A number of clinical studies have used Y-chromosome specific sequence-tagged site (STS) PCR markers to identify microdeletions in DNA from peripheral blood lymphocytes of infertile males. There is a lack of agreement concerning genotype/phenotype correlations, or the frequency and/or position of Yq microdeletions. The frequency of AZFc deletions varies considerably between investigations, from less than 1% to more than 35 %²⁻¹⁵. Attempts have also been made to correlate the position and extent of the deletions with dysfunction of different phases of male germ cell development, but studies have failed to define a strict genotype/phenotype correlations^{5,8,9,10}.

These observations raise several important issues. Differences in deletion frequency may be due to (i) absence of a standardized screening methodology (protocol), (ii) recruitment biases between studies, since the majority of the reports describe the analysis of only males with idiopathic infertility or have excluded obstructive azoospermia, (iii) they may reflect genuine population differences in the frequency of deletions, perhaps related to a combination of particular Y chromosome haplotypes, genetic background or environmental influences or (iv) marker density or the genomic markers selected could not only influence the estimation of deletion frequency but also may affect the interpretation of genotype/phenotype relationships. The possibility that

microdeletions may be present in non-idiopathic males also raises important ethical issues regarding patient management.

Here, we examined DNA samples from 131 consecutive men presenting with infertility, associated with reduced or absent sperm counts. We report Yq microdeletions in 19 % of males diagnosed as idiopathic and in 7 % of males with infertility due to known causes. The position and extent of the Y deletions was not significantly different between idiopathic and non-idiopathic groups.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

131 unrelated males presenting with infertility, associated with reduced or absence sperm counts were recruited in this study. They were subjected to detailed clinical investigations, including cytogenetic and endocrinology studies, physical examination and when possible, histology of a testis biopsy. Details of the groups of patients are summarised in table 1. Individuals were defined as azoospermic or severe oligozoospermic ($<5 \times 10^6$) or oligozoospermic ($<20 \times 10^6$) according to the criteria of the World Health Organisation. Serum follicle-stimulating hormone (FSH) and testosterone levels were measured using radioimmunoassay. Testicular volume was evaluated using an orchidometer. Each patient was tested for the presence of antisperm antibodies. As a control group, 50 men who had fathered at least two children were included in the study.

Molecular investigations

Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes using standard techniques. Where sufficient DNA was available, Southern blotting was performed on DNA to confirm the absence of Y chromosome markers. The STS primers and the conditions of amplification were described previously^{3, 18}. PCR amplifications found to be negative were repeated at least 3 times to confirm the deletion of a given marker. All investigations were performed without knowledge of the clinical diagnosis or the karyotype. The order of the markers shown has been previously published^{8, 19, 20}. All amplifications were performed separately. The testis determining gene *SRY* was used as a positive control in each case. A normal fertile male

and female were using as positive and negative controls for each STS amplification. PCR products were analysed on a 2% agarose gel. The STS primers tested on each subject were *SRY*, sY81, sY85, sY86, sY87, sY88, sY95, sY114, sY116, sY125, sY127, sY131, sY145, sY147, sY152, sY154, sY155, sY158, sY159, sY160, sY254, and sY255. Men deleted for any of these markers were further analysed using markers contiguous to the deleted marker (figure 1).

RESULTS

Clinical findings

The clinical findings are summarised in table 1. Of the 131 individuals included in this study, sperm counts revealed either azoospermia (the complete absence of spermatozoa; 63 % of cases), oligozoospermia (5-20 millions/ml; 30% of cases), severe oligozoospermia (<5 million/ml, 5% of cases), or asthenoteratozoospermia (abnormalities of sperm morphology; <2% of cases). Based on the clinical findings non-idiopathic infertility was diagnosed in 85 cases. Of the 85 cases, cytogenetic investigations revealed chromosome anomalies in 13 of these cases. These included two *SRY*-positive 46,XX males, two men with Klinefelter syndrome and two chromosomal translocations. In 46 cases, oligo- or azoospermia was diagnosed as idiopathic associated with an apparently normal 46,XY chromosome complement (see table 1).

Microdeletions

Clinical details of males with Yq deletions are summarised in table 2. The position and extent of the deletions are shown schematically in figure 1. Non-cytogenetically detectable microdeletions were detected in 14 of the 131

individuals with an 46,XY karyotype (I1-I9, S1-S4 and M1). If individuals with a chromosomal anomaly are excluded from the calculation the percentage of men with a microdeletion of Yq associated with idiopathic infertility is 9/46 (19%) and non-idiopathic infertility is 5/72 (7%). This latter figure excludes 13 men with cytogenetically-detectable anomalies.

All microdeletions were located either within, or overlapped with, previously defined AZFa, AZFb and AZFc regions. The majority of deletions included several adjacent markers. Only one deletion of markers sY82, sY83 and sY86 was observed in the AZFa region in a man with idiopathic azoospermia. This deletion is located within a 500 kb region of proximal AZFa located 5' to the *DFFRY* gene¹⁹. The *DFFRY* gene is predicted not to be disrupted by this deletion. The AZFb deletion interval spans between DYS205 (sY113) and DYS231 (sY143), a region estimated to be 1 to 3 Mb in size²⁰. A series of 7 overlapping interstitial deletions were identified that included AZFb. The extent of these deletions varied between individuals but all shared a common region defined by the marker sY114 (DYS206). In one individual only the marker sY114 was absent.

Interstitial microdeletions of the AZFc region were found in 5 individuals (3.8 % of total cases). All the five deletions resulted in the loss of all of the AZFc region including the DAZ gene cluster (I5, I7, I8, S1 and S3). Southern blot analysis confirmed the presence of deletions in the majority of the cases (I2, I4, I7, I8, I9, CA2, CA3, CA4, CA6, CA7, S2 S3 and M1). Representative Southern blots are shown in figure 2A and 2B.

Unfortunately, close male relatives were not available for study, hence we do not know if deletions were *de novo*. To determine if the deletions represented trival polymorphisms unrelated to the phenotype, we screened 50 DNA samples from normal fertile males using the same markers tested

on samples from the infertile group. No deletions were detected in any of these individuals suggesting that the absence of these markers is not a polymorphism.

Genotype/phenotype relationships

Microdeletions were observed in 19% of males diagnosed as idiopathic and in 7 % of males diagnosed as non-idiopathic associated with an apparently 46,XY chromosome complement (see figure 1). There was no obvious difference in the position or extent of the deletions between these two groups, with the exception of one patient diagnosed as having idiopathic azoospermia. He had a microdeletion of 3 contiguous markers in the AZFa region.

Four patients with large AZFb deletions was azoospermic (I3, I6, S4, M1). Patient S4 is affected by hypogonadotrophic hypogonadism and he was repeatedly treated with gonadotropins without any success. In one patient (M1), with an AZFb microdeletion, gonadal histology was available. This individual was diagnosed as non-idiopathic, having a combination of both varicocele and dysjunction of the epididymus and testis. Gonadal histology revealed spermatogenic arrest at the spermatocyte II phase. Although this observation would appear to support the conclusions of Vogt and colleagues, that AZFb deletions are associated with spermatogenic arrest at the spermatocyte stage⁴, other patients harboring partial AZFb microdeletions presented with a range of infertile phenotypes including oligozoospermia (only sY114 deleted, I2), severe oligozoospermia (proximal AZFb region deleted, I1, S2).

Deletions of AZFc are associated with a wide range of phenotypical features. Among the idiopathic patients two had severe oligozoospermia (I4 and I8) and two had azoospermia (I5 and I7). Gonad histology revealed Sertoli Cell Only syndrome in I5 and spermatogenesis arrest during meiosis in patient I7. In the non-idiopathic group with deletion of the entire AZFc region two patients (S1 and S3) presented in their medical history trauma of testis and orchiditis respectively. Patient S1 had severe oligozoospermia associated with hypospermatogenesis, while S3 presented azoospermia associated with spermatogenesis arrest at a pre-meiotic stage. In the latter case the Y chromosome deletion rather than the orchitis could be responsible for the spermatogenic arrest.

Although these data indicate that there is a considerable variation in the phenotype between men with similar Yq deletions, patients that carried deletions involving only one, or a small number of markers had a less severe phenotype irrespective of the position of the deletion. Patient I2 presented with oligozoospermia associated with the absence of marker sY114. Those individuals carrying larger deletions had a variable, though in general more severe, phenotype. It is difficult to interpret genotype/phenotype relationships in the group of patients who had cytogenetically detectable deletions of Yq (CA1-CA7), since in most cases, the deletion was associated with a chromosomal mosaicism that was detected in peripheral blood lymphocytes. Large Yq deletions, that include the heterochromatic region and the Yq/Xq pseudoautosomal region, may be directly responsible for the mosaicism.

DISCUSSION

Although we have found deletions in 19 % and 7 % of patients with idiopathic and non-idiopathic infertility respectively, associated with a 46,XY chromosome complement, it is probable that this figure is an underestimate. A higher density of markers may reveal other microdeletions. Some infertile men may have point mutations or other microrearrangements in Y-specific genes. PCR analysis only indicates the presence or absence of a particular locus, other rearrangements, such as duplications and triplications would not be detected. Both duplication and triplication events are relatively frequent in the Yq region²¹⁻²³ and may also result in dysregulation of gene. The PCR technique cannot detect mosaicism. Some infertile men may have cell populations in peripheral blood leucocytes that have a normal Y chromosome, and yet have some sperm populations which carry Y deletions. In a recent study, two infertile men who did not carry a deletion in peripheral blood cells conceived sons by assisted reproduction that had Yq microdeletions, indicating that the two fathers were mosaic for Y chromosome deletions²⁴.

Several genes on the Y chromosome have been proposed as candidate infertility genes. In AZFa the *DFFRY* gene encodes a protein involved in desubiquitination and has been proposed to play a role in gametogenesis²⁵⁻²⁶. Recently, an active copy of the *RBM* gene family has been mapped to distal AZFb (interval 6B in the region of sY142-sY145)^{27, 28}. All males in the current study who carried AZFb interstitial deletions were not deleted for this region suggesting that the active copy of *RBM* is not removed. Although it is possible that these microdeletion may have caused dysregulation of gene expression by a position effect, it is equally likely that these deletions result in the absence of other gene(s) necessary for normal

spermatogenesis. Recently, Lahn and Page described a number of genes and gene families on the Y chromosome including two that have been tentatively mapped to the 5L deletion interval, a region that is recurrently deleted in our group of AZFb deleted individuals²⁹. These are the genes, *chromodomain Y* (CDY), and *XK related Y* (XKRY), both of which are expressed specifically in testis.

The DAZ gene family has been proposed as candidate genes for the AZFc phenotype^{3, 5, 30}. However, deletions have been described within the AZFc region that do not include the DAZ gene family^{6, 7, 12}. In this study all the deletions included DAZ (sY254-sY255).

Y Chromosome Polymorphisms

In the majority of cases in this study, male relatives of the patients in the Yq deleted group were unavailable for study, and hence we do not know if the deletions are inherited. However, the majority of the deletions are large in both the idiopathic and non-idiopathic groups and hence are unlikely to represent polymorphisms. The marker sY114 has been used by Vogt and coworkers³¹ in a screen of males of known fertility failed to detect deletions of this marker. The sequence of sY114 is derived from the plasmid pYHa34, isolated by Vogt and colleagues using sequences derived from *Drosophila* Y chromosome sequences encoding fertility factors. Interestingly, the nuclear localisation of the *Drosophila* DAZL1 homolog, *Boule*, is dependent on the presence of a single fertility factor on the short arm of the *Drosophila* Y chromosome. The *Drosophila* Y chromosome encodes six fertility loci, each spanning four or more megabases of DNA. These repetitive sequences are transcribed stage-specifically in the nucleus of the primary spermatocyte as continuous long transcription units. During their transcription the RNA

accumulates specific nuclear proteins, which can be observed under light microscopy as distinct intranuclear structures (termed lampbrush structures or Y loops). Absence of the *ks-1* fertility locus results in the cytoplasm localisation of Boule in primary spermatocytes and does not seem to interfere with spermatid differentiation indicating that the role of boule in meiotic entry is independent of its nuclear localisation. As suggested by Wasserman and colleagues, the Y chromosome loops may serve as a storage for boule and other RNA-binding proteins³². The breakdown of the lampbrush Y chromosome loops which occurs at the end of the spermatocyte growth phase may result in the release of these factors in a synchronous fashion³².

Mechanism of Y deletions

It has been estimated that between 50-70% of the non-recombining region of human Y chromosome is composed of a variety of highly repeated DNA elements, the majority of which appear to be unique to the human Y chromosome³³. Deletions of the Y chromosome are likely to be consequence of these repeated elements causing intrachromosomal recombination. The instability of the Y chromosome is illustrated by the transmission of a Y deletion from a fertile father to his infertile son³⁴. The deletion was found to be larger in the son compared with the father. Evidence suggests that both genetic and environmental factors may be effective in invoking deletion formation. Edwards and Bishop³⁵, suggested that some men are genetically predisposed to deletion formation (perhaps caused by genetic factors that regulate chromosomal associations/chiasma formation during meiosis, by a higher density of repetitive elements on their Y chromosome, or specific Y chromosome sequence organisation that facilitates deletion formation). We are currently testing this hypothesis by analysing Y chromosome repetitive

sequences in men with Yq microdeletions and, in parallel, defining the position of Y chromosome deletions in infertile males of widely differing ethnic and geographic origin.

Assisted male reproduction

The association of Y chromosome deletions together with a diagnosis of non-idiopathic infertility was an unexpected finding. There are relatively few studies of the Y chromosome in males with infertility of apparently known causes. Three reports describe deletions associated with either varicocele or cryptorchidism, however this is not a particularly surprising finding since the contribution of either varicocele or cryptorchidism as the primary cause of infertility is rarely defined. Recently, Pyror and colleagues identified Yq microdeletions in 4 individuals classified as non-idiopathic. These were two azoospermic men with varicocele and two men with spermatic duct obstruction. However, these microdeletions could be unrelated polymorphisms since a similar microdeletion was reported in a normal fertile male in the same study. Here, for the first time, we describe a significant percentage of large Yq deletions of the AZFb and AZFc regions associated with non-idiopathic infertility including hypogonadotropic hypogonadism, trauma, orchitis, bilateral cryptorchidism and epididymal-testicular dysjunction. In males with a known cause of infertility the possibility that Y chromosome microdeletions may also contribute to spermatogenic failure should be explored particularly where detailed gonad histology indicates spermatogenetic arrest.

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is the technique of choice in severe male factor infertility and consists of the insertion of a single spermatozoon or spermatid into the cytoplasm of a mature oocyte³⁶. Concerns have been

expressed that this method may allow genetic defects to be added to the gene pool³⁷. Although several studies have not found any evidence for an increased malformation rate among children conceived using ICSI, it is possible that the genetic anomalies causing the infertility could be transmitted to male offspring³⁸. ICSI is a relatively new technique and the long term genetic effects are unknown. Our findings that Yq deletions can occur in 19% of males diagnosed with idiopathic infertility, and, significantly, in 7% of non-idiopathic infertile males raise important questions concerning the screening of Y deletions and genetic counselling. Current protocols recommend that men with idiopathic severe oligozoospermia or non-obstructive azoospermia are screened for Y chromosome deletions. On the basis of our data we recommend a more extended screening program to include all men, idiopathic and non-idiopathic seeking ICSI treatment who present sperm concentration less than $5 \times 10^6/\text{ml}$.

Aknowledgements

REFERENCES

1. Tiepolo, L. & Zuffardi, O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the non fluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum. Genet.* **34**, 119-124 (1976).
2. Kobayashi, K. *et al.* PCR analysis of the Y chromosome long arm in azoospermic patients: evidence for a second locus required for spermatogenesis. *Hum. Mol. Genet.* **3**, 1965-1967 (1994).
3. Reijo, R. *et al.* Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genet.*, **10**, 383-393 (1995).
4. Vogt, P.H. *et al.* Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum. Mol. Genet.*, **5**, 933-943 (1996).
5. Reijo, R. *et al.* Severe oligospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet*, **347**, 1290-1293 (1996).
6. Stuppia, L. *et al.* Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome detected by STS-PCR in 6 of 33 patients with idiopathic oligo- and azoospermia. *Cytogenet. Cell. Genet.* **72**, 155-158 (1996).
7. Najmabadi, H. *et al.* Substantial prevalence of microdeletions of the Y-chromosome in infertile men with idiopathic azoospermia and oligospermia detected using a sequence tagged site based mapping strategy. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* **81**, 1347-1352 (1996).
8. Pryor, J.L. *et al.* Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *New Eng. J. Med.*, **336**, 534-539 (1997).

9. Simoni, M. *et al.*. Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (Deleted in AZoospermia) gene in azoospermia and severe oligospermia. *Fertil. Steril.* **67**, 542-547 (1997).
10. Qureshi, S.J. *et al.* PCR screening for Y chromosome microdeletions: a first step towards the diagnosis of genetically determined spermatogenic failure in men. *Mol. Hum. Reprod.* **2**, 775-9, (1996).
11. Kremer, J.A.M. *et al.* Microdeletions of the Y chromosome and intracytoplasmic sperm injection: from gene to clinic. *Hum. Reprod.* **12**, 687-691 (1997).
12. Foresta, C. *et al.* Y-chromosome deletions in idiopathic severe testiculopathies. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* **82**, 1075-1080, (1997)
13. van der Ven, K. *et al.* Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening in males undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Mol. Hum. Reprod.* **3**, 699-704 (1997).
14. Simoni, M. *et al.* Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (Deleted in AZoospermia) gene in azoospermia and severe oligozoospermia. *Fertil. Steril.* **67**, 542-7, (1997)
15. Girardi, SK. Mielnik A. Schlegel PN. Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men. *Hum. Reprod.* **12**, 1635-41, (1997)
16. Hull, M.G.R. *et al.* Population study of causes, treatment and outcome of infertility. *Brit. Med. J.*, **291**, 1693-1697 (1985).
17. Hargreave, T.B. Human Infertility. In Hargreave T. B. (ed.) *Male Infertility* 2nd edn. Springer Verlag, London, pp 1-16 (1994).
18. Vollrath, D. *et al.* The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science*, **258**, 52-59 (1992).

19. Brown, G.M. *et al.* Characterisation of the coding sequence and fine mapping of the human DFFRY gene and comparative expression analysis and mapping to the SXR(B) interval of the mouse Y chromosome of the Dffry gene. *Hum. Mol. Genet.* 7, 97-107 (1998).
20. Affara, N. *et al.* Report of the second international workshop on Y chromosome mapping 1995. *Cytogenet. Cell Genet.*, 73, 33-76 (1996).
21. Jobling, M.A. *et al.* Recurrent duplication and deletion polymorphism on the long arm of the Y chromosome in normal males. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1767-1775 (1996).
22. Santos, F.R. *et al.* Geographic differences in the allele frequencies of the human Y-linked tetranucleotide polymorphism DYS19. *Hum. Genet.* 97, 309-313 (1996).
23. Spurdle, A.B. & Jenkins, T. The specific pDP31 rearrangement polymorphism in Southern African populations. *Hum. Hered.* 44, 261-265 (1994).
24. Kent-First, M.G. Infertility in intracytoplasmic-sperm-injection-derived sons. *Lancet* 348, 332 (1996).
25. Jones, M.H. *et al.* The Drosophila developmental gene fat facets has a human homologue in Xp11.4 which escapes X-inactivation and has related sequences on Yq11.2. *Hum. Mol. Genet.*, 5, 1695-1701 (1996).
26. Fischer-Vize, J.A. *et al.* The fat facets gene is required for Drosophila eye and embryo development. *Development*, 116: 985-1000 (1992).
27. Elliott, D.J. *et al.* Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 3848-3853 (1997).

28. Ma, K. *et al.* A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling spermatogenesis. *Cell*, 75, 1287-1295 (1993)
29. Lahn, B.T. and Page, D.C. Functional coherence of the human Y chromosome. *Science*. 278 675-680 (1997).
30. Saxena, R. *et al.* The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nature Genet.* 14 292-299 (1996).
31. Vogt P. Keil R. Kohler M. Lengauer C. Lewé D. Lewé G . Selection of DNA sequences from interval 6 of the human Y chromosome with homology to a Y chromosomal fertility gene sequence of *Drosophila hydei*. *Human Genetics*. 86:341-349, 1991
32. Cheng MH, Maines JZ, Wasserman SA Biphasic subcellular localisation of the DAZL-related protein Boule in *Drosophila* spermatogenesis. *Development Biology* 204: 567-576 1998.
33. Cooke, H. *et al.* Structure and evolution of human Y chromosome DNA. *Differentiation*. 23 Suppl, S48-55, 1983.
34. Stuppia, L. *et al.* Widening of a Y-chromosome interval-6 deletion transmitted from a father to his infertile son accounts for an oligozoospermia critical region distal to the RBM1 and DAZ genes. *Am. J. Hum. Genet.* 59: 1393-1395 (1996).

35. Edwards, R.G. & Bishop, C.E. On the origin and frequency of Y chromosome deletions responsible for severe male infertility. *Mol. Hum. Reprod.* 3, 549-54 (1997).
36. Van Steirteghem, A.C. *et al.* Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 8, 1061-1066 (1993).
37. de Kretser, D. The potential of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) to transmit genetic defects causing male infertility. *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 137-142 (1995)
38. Bonduelle, M. *et al.* Comparative follow up study of 130 children born after intracytoplasmic sperm injection and children born after in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 10, 3327-3331.

Legend to Figure :

Figure 1. A schematic representation of the human Y chromosome showing, on top, the deletion intervals defined by Vergnaud and colleagues¹⁸. The position of genes and gene families are indicated. Below, sequence tagged sites are shown that correspond to the position of each deletion interval. Patient number is indicated to the left of the panel, which shows the extent of the deletion for each patient. Solid bars indicate the presence of STS markers and shaded bars sites that were not tested but assumed to be positive. Open bars indicate markers that were not studied in the patient. Dashes indicate markers that were found to be negative. The positions of AZFa, AZFb and AZFc are shown.

Figure 2. Representative Southern blots of the Yq deletions. (A) Hybridisation with the eIF1A cDNA. A male and female common band of is present. A male specific band of 4 Kb corresponds to the eIF1AY isoform. Individuals CA2 (lane 9), CA4 (lane 10) and CA7 (lane 12) are deleted for eIF1AY.

(B) Hybridization with a DAZ gene fragment. a male and female common band is observed of 2.1 kb in size. Male-specific bands of 3 kb and 1.6 kb are present. Individuals in lane 2, 7, 8, 10 and 11 who lack the male-specific fragments correspond to the cases I4, S3, I7, CA6 and CA7 respectively.

Table 1. Summary of findings during andrological history and examination in 131 men affected by couple infertility

	n	Cryptorchidism	Varicocele	Testicular dysfunction			Cytogenetic anomalies***	CBAVD	Ejaculatory dysfunction	No findings
				Non-obstructive*	Obstructive	Miscellaneous**				
Azoospermia	83	9	4	8	5	15	11	3	1	27
Severe Oligozoospermia (< 5 million/ml)	39	5	6	4	2	4	2	-	-	16
Oligozoospermia (5-20 million/ml)	7	1	1	1	1	-	-	-	-	3
Astenoteratozoospermia	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-
Total number	131	15	13	13	8	19	13	3	1	46

CBAVD: Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens.

* Includes patients with medical history of orchitis, inguinal surgery, recurrent urogenital infections, endocrine diseases.

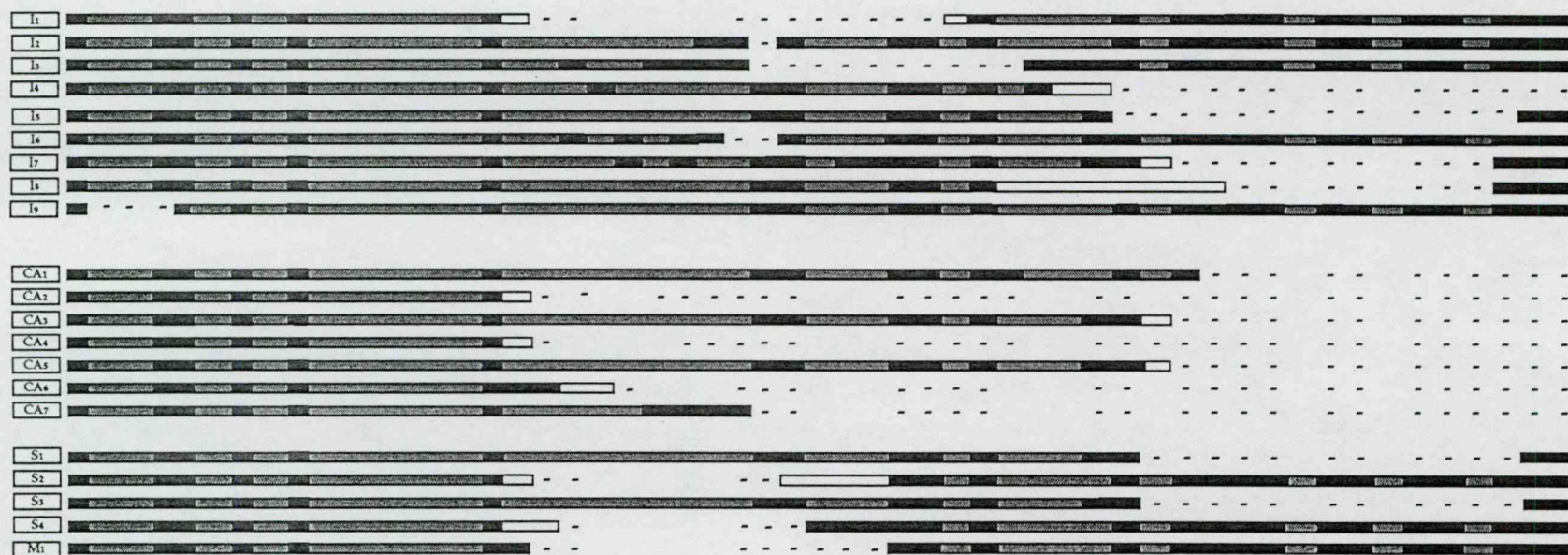
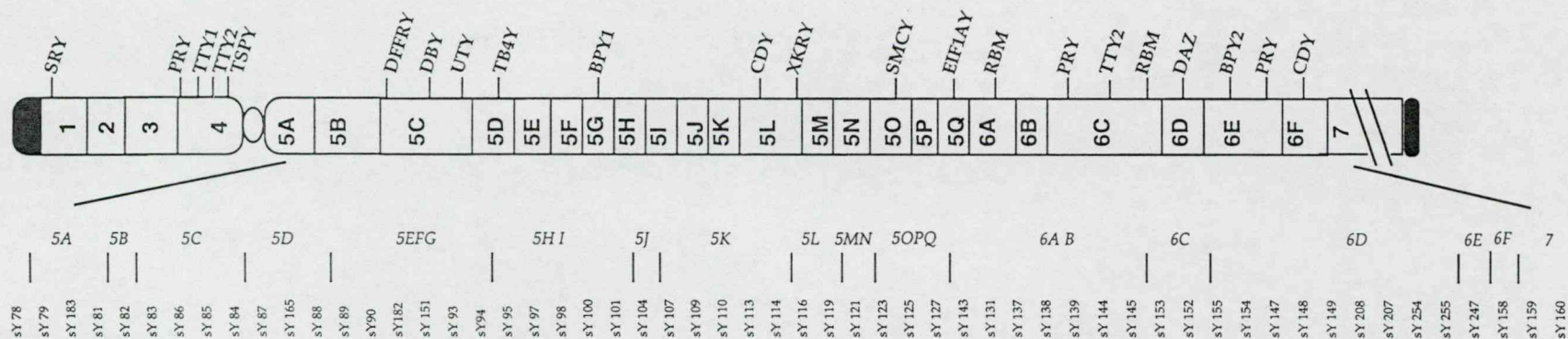
**Includes patients with both non-obstructive and obstructive testicular dysfunction.

***Includes patients with chromosomal mosaicism, Yq-deletions, chromosome translocations, XX males and Klinefelter syndrome.

Table 2. Phenotypic features of men with Yq microdeletions.

Patient	Age	Sperm Concentration (million/ml)	Testis volume left right	FSH	Clinical findings (medical history, andrological examination)	Testicular histology	Karyotype
I1	34	<1	N N	↑	no findings	NA	46XY
I2	NA	<20	NA NA	NA	no findings	NA	46XY
I3	30	azoospermia	N N	↑	no findings	NA	46XY
I4	33	<1	↓ ↓	NA	no findings	NA	46XY
I5	29	azoospermia	N N	N	no findings	SCOS	46XY
I6	31	azoospermia	N N	↑	no findings	NA	46XY
I7	32	azoospermia	NA NA	N	no findings	SGA meiosis	46XY
I8	28	<1	NA NA	↑	no findings	NA	46XY
I9	28	azoospermia	NA NA	NA	no findings	NA	46XY
CA1	28	azoospermia	N N	N	no findings	NA	45,X/46,Xr(Y)
CA2	31	azoospermia	NA NA	NA	no findings	NA	46,X del(Y)(q12:qter)
CA3	30	azoospermia	Anorchia	NA	no findings	Seminoma	45,X/46,XY
CA4	29	azoospermia	NA NA	NA	no findings	NA	46,X del(Y)(q11.2:qter)
CA5	32	azoospermia	N N	↑	no findings	SGA pre-miosis	45,X/46,XY
CA6	36	azoospermia	NA NA	NA	no findings	NA	45,X/46,X del(Y)(q11.2:qter)
CA7	28	azoospermia	NA NA	NA	no findings	NA	45,X/46,X del(Y)(q12:qter)
S1	NA	<1	N N	N	Trauma testis	HSG	46XY
S2	32	<1	N N	NA	Infections	NA	46XY
S3	30	azoospermia	NA NA	↑	Orchitis	SGA pre-meiosis	46XY
S4	29	azoospermia	↓ ↓	↓	HHG		46XY
M1	29	azoospermia	NA NA	N	Varicocele Dysjunction epididym/testis	SGA spermatocytes II°	46XY

HHG=HYPOGONADOTROPHIC HYPOGONADISM; HSG=HYOSPERMATOGENESIS; SGA=SPERMATOGENIC ARREST



AZFa

AZFc

AZFc

- = Positive
- ▨ = Not tested assumed positive
- = Not tested
- = Negative

PAPER VI

MAGYAR ANDROLÓGIA

HUNGARIAN

ANDROLOGY

ISSN 1416-9495

AZ ELSŐ MAGYAR ANDROLÓGIAI TUDOMÁNYOS ÉS OKTATÓ SZAKFOLYÓIRAT

Főszerkesztő
Editor in chief

Papp György
(Budapest)

Főszerkesztő-helyettes
Co-ordinating editor

Kopa Zsolt (Budapest)

Szerkesztő
Editor

Szöllősi János (Szeged)
Kéry Sándor (Debrecen)

Szerkesztő bizottság
Editorial board

A. Belker (Louisville)
F. Comhaire (Gent)
J. Frick (Innsbruck)
H. J. Glander (Leipzig)
Hoznek A. (Paris)
D. Pozza (Roma)
J. Pryor (London)
H. Pusch (Graz)
C. Schirren (Hamburg)
R. Schoysman (Brussels)
J. P. da Silva (Lisboa)
S. Tellaloglu (Istanbul)



Tudományos tanácsadó bizottság
Scientific advisory board

DERMATOLÓGIA:

E. Günther (Jena)
Horváth A. (Budapest)

UROLÓGIA:

Frang D. (Budapest)
Scultéty S. (Szeged)
Répássy D. (Budapest)
K. Bolayir (Cyprus)

ASSZ. REPRODUKCIÓ:

Bernárd A. (Budapest)
Kőrösi T. (Győr)
Urbancsek J. (Budapest)

ENDOKRINOLÓGIA:

Szarvas F. (Szeged)
Siklósi Gy. (Budapest)
Szendei Gy. (Budapest)

CSALÁDTERVEZÉS:

Aszódi I. (Miskolc)
Lantos I. (Budapest)

PSYCHOLÓGIA:

Klettner A. (Budapest)

LABOR:

Berényi M. (Budapest)
Olajos F. (Budapest)

IV. KÖTET – VOL. IV.

MEGJELENIK
NÉGYHAVONTA

'99/3

MAGYAR HUNGARIAN ANDROLOGY ANDROLÓGIA

TARTALOMJEGYZÉK

MAGUNK RÉSZÉRŐL...	73
Szakmapolitikai közlemény	
SCHIRREN C.	77
Az induratio penis plastica sebészi kezelése	
BESZÁMOLÓ A MAGYAR ANDROLÓGUSOK 1999. ÉVI TUDOMÁNYOS SYMPOSIUMÁRÓL	80
GERENDAI	81
A herék és a heréket szabályozó struktúrák asszimetriájáról	
KÖNYVRECENZÍÓ	87
A HIETE Urológiai és Andrológiai Klinikájának tanfolyamai	
ÚJ ASPEKTUSOK A PEYRONIE BETEGSÉG (IPP) KONZERVATÍV KEZELÉSÉBEN	89
Hauck E. W., Kerkhof-Garab E., Schroeder-Printzen I., Wreidner	
KONGRESSZUSI BESZÁMOLÓ	95
TÁRSASÁGI HÍREK	98
ERDEI E, MAGYAR É, LELLEI I, RÓZSAHEGYI J, LAKI A, RUSZ A, KARSZA A.	99
A herebiopsia jelentősége az asszisztált reprodukció szempontjából	
KONGRESSZUSI NAPTÁR	104
RURIK I.,	105
Andrológia háziorvosi gyakorlatban	
A HEREBIOPSZIA SZEREPE AZ ANDROLÓGIAI GYAKORLATBAN	108
Seregély A, Temesváry B, Godó	
TARTALOMJEGYZÉK	

REVIEW

HIETE UROLÓGIAI KLINIKA, PATOLÓGIAI
INTÉZET*, RADIOLOGIAI KLINIKA**

A herebiopszia jelentősége az asszisztált reprodukció szempontjából

ERDEI E., MAGYAR É.*, LELLEI I.*, RÓSAHEGYI J.,
LAKI A.**, RUSZ A., KARSZA A.

KEY WORDS

Testis biopsy, FSH, assisted reproductive technology, male infertility

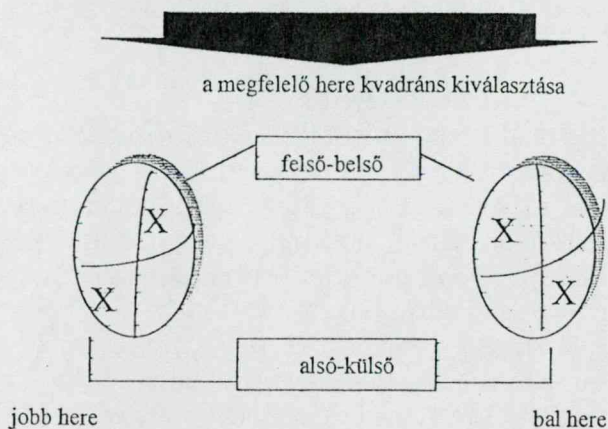
SUMMARY

The authors have performed testis biopsy on 21 male patients by a pre-designed protocol. The biopsy has been carried out with the application of microsurgery, with scrotal excision, with the exposure of both teste. The results have been evaluated according to the spermogram groups. During the analysis the samples from the testes have been compared with the FSH rates. They have been trying to get an answer to that controversial question of what kind of correlation can be established between the FSH levels during the quantitative analysis of tissue samples. Their method and experiences have been primarily evaluated regarding the effectiveness of assisted reproduction.

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők 21 férfitegnél végeztek herebiopsziát előre meghatározott protokoll szerint. A biopszia minden esetben scrotális excisióból, mindkét oldali here feltáráásával, mikrosebészeti módszerrel történt. Eredményeiket a spermogram alapján kialakított csoportok szerint értékelték. Az analízisek során összehasonlították az FSH értékeket a két heréből nyert szöveti mintákkal. Megpróbáltak választ kapni arra a vitatott kérdésre, hogy milyen összefüggés található az FSH szintek és a szöveti minták kvantitatív

analízise során. Módszerüket és tapasztalataikat elsősorban az asszisztált reprodukció eredményessége szempontjából értékelték.



1. ábra. A herebiopszia sematikus képe

BEVEZETÉS

A here szerkezetének biopsziás anyagból történt vizsgálata a férfi meddőség kezelési esélyeinek megítélésére az 1930-as évek vége felé kezdődött.

Charny, Hotchkiss és Engle végeztek elsőként herebiopsziát. Ugyancsak az ő nevükhöz fűződnek az első közlemények is (3, 6), amelyek 1940 és 42 között láttak napvilágot ebben a témában. Úgy tűnt, hogy a herebiopszia, mint vizsgáló módszer, minden részletében, teljességgel ismert. A technika is kialakult és széles körben gyakorolt eljárássá vált a férfi infertilitás területén tevékenykedő szakemberek körében (1, 9, 10, 13).

A férfi meddőség diagnosztikájában az alapvető vizsgálati módszer a sperma vizsgálata. Ez azonban számos esetben alig vagy semmiféle felvilágosítást nem ad a here tényleges ondósejt termelő képességéről, például az azospermiák és súlyos oligozoospermiák eseteiben, amikor a herebiopszia elvégzése elengedhetetlen (21, 22). Amellett, hogy a hisztológiai vizsgálat lényege alapvetően nem változott, a tudomány fejlődése következtében néhány, eddig megtingathatatlannak elv megváltoztatására kényszerült a szakterület. Az asszisztált reprodukciós technikák kialakulásával és elterjedésével a herebiopszia szerepe más megvilágításba került (15).

A reprodukcióval foglalkozó szakemberek körében ismert jelenség, hogy a születésszám a világ számos országában jelentősen csökkent, egyes államokban elérte a kritikus értéket. Hazánkban is érezhető ez a tendencia.

A reprodukciós medicina létrejöttével és fejlődésével, a humán reprodukció elősegítésére, olyan új eljárások alakultak ki, mint például a mikro-asszisztált módszerek, amelyek eddig elképzelhetetlen távlatokat nyitottak a humán embriók keletkezésére (14). A legmodernebb technika, az ICSI kombinálása a közvetlenül a hereszövetből nyert

ondósejt extrakcióval, más néven TESE-vel (Devroey 1995) a herebiopsziának is új értelmet adott, megnövelve ezzel jelentőségét. Ettől az időponttól kezdve nem csak diagnosztikus értékű, de terápiás jelentőséggel is bír (17).

ANYAG ÉS MÓDSZER

Intézetünk anyagában 1997. és 1998. június között 23 férfinél végeztünk herebiopsziát, amelyből 21 esetet dolgoztunk fel. A betegek kivizsgálása meghatározott management szerint történt, amely kórtörténetre, fizikális vizsgálatra, sperma analízisre, scrotális UH-ra, hormonvizsgálatra, és genetikai vizsgálatra épült (20).

A 21 beteget a spermogram és spermacytogram alapján 4 csoportba soroltuk. Az esetek megoszlását az 1. táblázatban foglaltuk össze. Az andrológiai konzultációra érkezett betegek között az azoospermias és súlyos oligozoospermias betegek aránya 38% volt. Azonban az oligozoospermias betegek csoportjában, amelynek aránya 57% volt, sem haladta meg a spermium szám koncentráció 12 millió/ml értéket.

1. táblázat. A vizsgált esetek megoszlása a spermogram alapján

csoport	esetszám	conc.
I. Azoospermia	4	0-0,9
II. Súlyos oligoospermia	4	1-4,9
III. Oligozoospermia	12	5-12
IV. Asteno-teratozoospermia	1 (normális spermium szám mellett)	>20
Total	21	

A herebiopszia technikája:

Az általunk alkalmazott herebiopszia bilaterális, nyitott sebészi biopszia. Minden esetben scrotális explorációból történik, a ráfé vonalában ejtett feltárásból. A scrotalis exploráció lehetőséget nyújt a perioperatív diagnosztika előnyeinek kihasználására (5), a here turgorának, a here-mellékhere viszonyának pontosabb megítélésére. Ugyancsak kedvezően használható a képalkotó diagnosztika során felismerésre nem kerülhető elváltozások diagnosztikájára (18). Ugyanakkor segítséget nyújt a varicocele súlyossági fokának pontosabb megítélésben is (2). Tekintettel arra, hogy a vizsgált betegeknél több, mint egyharmad részben súlyos ondókép zavart észleltünk, az általunk alkalmazott scrotalis exploráció hatékony módszere lehet a diagnosztikus eszköztárnak. Mindkét heréből két-két biopsziás mintát veszünk általában a felső-belső és alsó-külső negyedből, mikrosebészeti módszerrel, atraumatikus módon. Ettől a módszertől csak abban az esetben térünk el, ha az valamilyen ok miatt a protokollban meghatározottak

szerint nem volt kivitelezhető. A here sebzés zárására 6/0, atraumatikus, felszívódó fonalat használtunk, a burkokat 5/0 ugyancsak felszívódó, atraumatikus fonallal zárjuk.

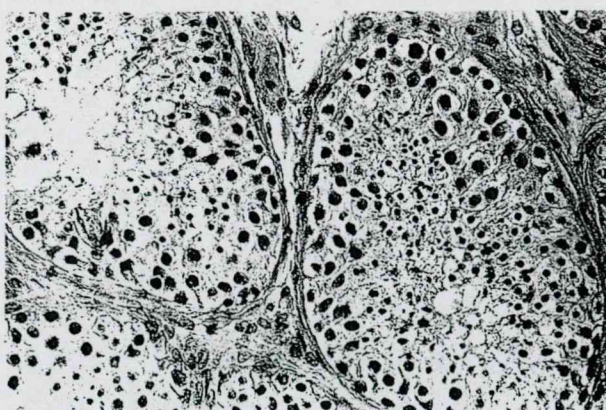
Más neves külföldi intézet andrológiai centrumával végzett megelőző, közös tanulmányaink arra a következtetésre vezettek, hogy a herében az ondósejt termelés nem homogen jelenség, ezért a herék különböző területeiről egyidejűleg vett biopsziás minták információs értéke meggyőzőbb a hagyományos módon történő anyagvételtől.

Az általunk kialakított módszerrel arra akarunk választ kapni, hogy a here különböző területeiről származó biopsziás anyagokban van-e eltérés, és ha igen, milyen mértékű? Az így kapott eredmények milyen összefüggést mutatnak a follikulus stimuláló hormon értékével (FSH)?

EREDMÉNYEK

A kapott adatok értékelését a spermogram alapján kialakított csoportok szerint végeztük.

I. Az azoospermias betegek csoportjába négy beteg tartozott, minden beteg 46, XY kariotypussal rendelkezett. Táblázatban foglaltuk össze az egyes esetekben mért FSH értékeket és a szöveti analízis eredményét. A hormonszintjeik 7,2 és 24,5 U/l értékek között változtak. Ennek alapján normális, enyhén és jelentősen emelkedett hormon értékekről beszélhetünk. Az I. csoportba tartozó betegek közül egy esetben találtunk mind a négy biopsziás anyagra kiterjedő Sertoli Cell Only Syndromát (SCOS). Lásd a 2. ábrát. Egy másik esetben a beteg egyik heréjében nem találtunk kifejlődött ondósejtet, sem a felső, sem az alsó pólus környékéről vett biopsziás anyagban, korai érési gátlás azonban megfigyelhető volt. A másik herében szerény ondósejt termeléssel egyidejű vegyes érési gátlás volt látható (12).



2. ábra

Sertoli cell only (syndroma) SCOS szöveti képe. Hematoxilineozin festés, 300-szoros nagyítás.

A legmagasabb hormonszint mellett a két here négy kvadránsából háromban nem volt érett spermium, de érési gátlás észlelhető volt. Ugyanakkor a negyedik kvadránsban a spermatogenezis megfelelő képet mutatott. Lásd a 2. táblázatot, amely az azoospermias betegek megoszlását mutatja

be a FSH érték és a négy szövettani minta kapcsolata alapján. A feltüntetett %-os érték arra utal, hogy az azonos területhez tartozó biopsziás minta milyen %-ban reprezentálja a látott képet.

2. táblázat. Az azoospermiás betegek megoszlása FSH érték és szövettani eredmény szerint

esetszám: 4/21
kariotípus: 4/46,XY

N	FSH (U/l)	Szöveti eredmény		
		Bal here	Jobb here	here kvadráns
1	12,9	eltávolított	34	fb
3	17,1	SCO 100%	SCO 100%	fb
		SCO 100%	SCO 100%	ak
10	7,2	0 (Stc) 100%	7 (Std) 30%	fb
		0 (Stc) 100%	8 (Stc) 5%	ak
15	24,5	0 (Stc) 100%	0 (Stc) 100%	fb
		0 (Stc) 100%	23 60%	ak

Stc=spermatoctya, Std=spermatida,
fb=felső-belső kvadráns, ak=alsó-külső kvadráns

3. táblázat A súlyos oligozoospermiás betegek megoszlása FSH érték és szövettani eredmény szerint

esetszám: 4/21
kariotípus 4/46,XY

N	FSH (U/l)	Szöveti eredmény		
		Bal here	Jobb here	here kvadráns
4	5,9	0 100%	0 100%	fb
		27 (Std) 77%	8 10%	ak
9	27,5	0 100%	0 100%	fb
		23 100%	0 (Stc) 100%	ak
13	8,5	0 100%	13 84%	fb
		—	37 100%	ak
21	7,8	—	8 (Stc) 60%	fb
		—	2 (Stc) 35%	ak

Stc=spermatoctya, Std=spermatida,
fb=felső-belső kvadráns, ak=alsó-külső kvadráns

4. táblázat A oligozoospermiás betegek megoszlása az FSH érték és szövettani eredmény szerint

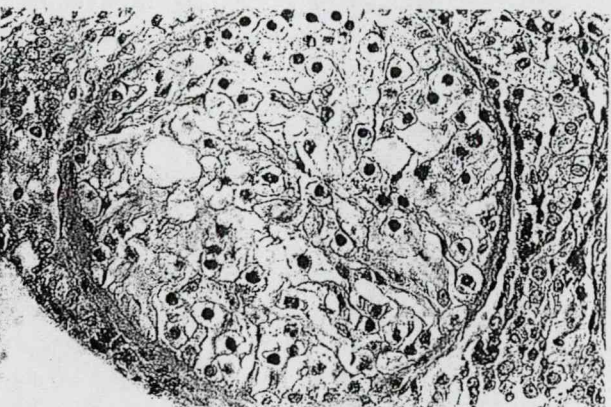
sperma koncentráció:	<12M/ml
esetszám:	12/21
normális FSH:	11/12
kariotípus:	12/46,XY
I. Érésí gátlás nélkül:	8/12 (2, 5, 11, 16, 17, 18, 19, 20) szöveti analízis: kiegyenlített, jó spermatogénézis mindkét here mindkét kvadránsában (24-33 spermium/tubulus)
II. Érésí gátlással:	4/12 (6, 7, 8, 14) szöveti analízis: változó spermatogénézis, nagy szórás a tubulusonkénti ondósejtszámban (0-37 spermium/tubulus)

II. A súlyos oligozoospermiás betegek száma eseteink között ugyancsak négy volt. Ezeknél a férfiaknál a sperma koncentráció kisebb értéket mutatott, mint 5 millió/ml. A kariotípus minden betegnél normális volt, 46, XY. Eredményeiket a 3. táblázat tartalmazza. Az ehhez a csoporthoz tartozó négy esetből kettőben a here szöveti képe a

spermatogénézis súlyos károsodását mutatta, amely folyamat korai és késői érési gátlással szövődött, és mindkét herére kiterjedt. Lásd a 3. és 4. ábrát. Egy esetben jelentős FSH szint emelkedés mellett a négy biopsziás mintából egyben, a bal here alsó-külső területéről származó anyagban kielégítő spermatogénézist találtunk érési gátlás nélkül.



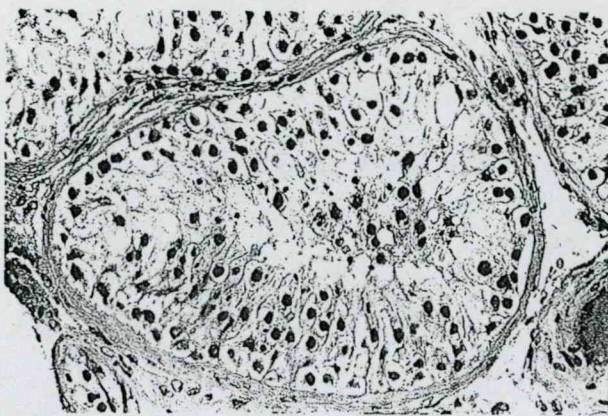
3. ábra Korai érési gátlás képe. Hematoxilineozin festés, 300-szoros nagyítás



4. ábra Késői érési gátlás képe. Hematoxilineozin festés, 300-szoros nagyítás

III. A közepesúlyos oligozoospermiák csoportjába tizenkét esetet soroltunk. Vizsgált eseteinkben a spermakonzentráció kisebb volt, mint 12 millió/ml, (5 és 12 millió/ml közé esett). Tizenkét eset közül tizenegyben találtunk normális FSH értéket. Tizenkettőből nyolc betegnél jó spermatogénézist észleltünk, érési gátlás nélkül. Az ondósejt termelés kiegyenlített képet mutatott, az ondósejtek átlagos száma 24-33 között volt tubulusonként. További négy esetben a spermatogénézis változatos képet mutatott, amelyet jól tükrözött a spermiumok tubulusonkénti száma is. Ez az érték 0 és 37 között váltakozott, és érési gátlás is társult a spermatogénézis károsodásával (16).

IV. Vizsgálati anyagunkban egy betegnél találtunk normális ondósejtszám mellett asthenoteratozoospermiát, normális FSH értékkel. A szöveti analízis kitűnő spermatogénézist mutatott, érési gátlás nem volt észlelhető. Lásd az 5. ábrát.



5. ábra Normális spermatogenezis képe. Hematoxilin-eozin festés. 300-szoros nagyítás

MEGBESZÉLÉS

Az intracitoplazmatikus sperma injekció bevezetése óta elviekben egyetlen spermium is elegendő a petesejt megtermékenyítéséhez. Azokban az esetekben, amikor azozoospermia vagy súlyos fokú oligozoospermia áll fenn, a megtermékenyítéshez szükséges ondósejt közvetlenül a here szövetből nyerhető (14, 19). Bár vannak közlemények, amelyek a kerek ondósejtek felhasználásával létrejött megtermékenyítésről számolnak be, a jelenleg elfogadott álláspont azonban mégis az, hogy a mikromanipuláció, a teljes érési fázison keresztül jutott, elongált alakú ondósejttel történjen. Ahhoz, hogy a fekdáció ne csak a mikromanipulációt követő in vitro időszakban álljon fenn, hanem meginduljon az egészséges embriók fejlődése, majd létrejöjjen a biológiai terheség és azt követően a további in vivo fejlődés eredményeként egészséges magzat születéssé, számos feltételnek kell teljesülnie. Ezek közül az egyik legalapvetőbb, hogy az anyai és apai gaméták jó minőségűek legyenek. A spermiumok esetén ez a feltétel akkor teljesülhet, ha a fejlődésükhöz szükséges hormonális milió és mikrokörnyezet stabil (11). Ennek elengedhetetlen feltétele, a hereszövet megfelelő mikrokeringése. A mikrocirkuláció ép vagy érintett volta a herebiopszia kapcsán felismerésre kerül, a műtéti korrekció vagy a tervezett terápia prognózisának fontos láncszeme (2, 20).

KÖVETKEZTETÉSEK

Más, a nemzetközi irodalomból ismert szerzők munkáihoz hasonlóan saját eredményeink is azt igazolják, hogy az FSH érték jelentős emelkedése sem jeltheti a herebiopszia kontraindikációját (15, 17). Még magas, a normális FSH értéket több, mint kétszeresen meghaladó hormonszint esetén is találtunk a négy szövettani mintából legalább egyben kielégítő spermatogenezist (5). Bár jelenleg csak kevés esetszámon tudjuk igazolni, de táblázatainkból kitűnik, hogy nincs pontos lineális összefüggés az FSH érték emelkedése és a tubulusok károsodásának mértéke között. Lásd az azozoospermias és súlyos oligozoospermias betegek adatait tartalmazó táblázatokat.

Véleményünk szerint a súlyos fertilitási zavarban szenvedő betegek esetében diagnosztikus herebiopsziát mindig célszerű elvégezni a terápiás herebiopszia előtt (20). A szöveti analízis eredményei segítséget nyújtanak a here állapotának pontos megítélésében. Eseteink a nemzetközi irodalom adataival alátámasztva, azt igazolják, hogy a hereműködés objektív megítélésére egy biopsziás anyag nem elegendő (5).

A több helyről történt diagnosztikus mintavétel megteremteti a lehetőséget annak, hogy a fertilizációs program során a terápiás mintavétel célzottan történhessen, a herének a spermatogenezis szempontjából legértékesebb területéről (8).

Az asszisztált reprodukciós programban résztvevő párok kivizsgálásában jelentős szerepet tölt be a reprodukciós medicinában jártos hisztológus. Munkáját eredményesen befolyásolja a klinikussal kialakított szoros együttműködés.

Az asszisztált reprodukciós technikák eredményességének feltétele a reprodukciós medicinában érintett szakemberek magas szintű szakmai kollaborációja. A legmodernebb terápiás lehetőségek birtokában sem szabad azonban megfedkezni a gyógyítás legfontosabb alapelvéről, amely a megalapozott diagnosztikára épített adekvát terápiára épül.

IRODALOM

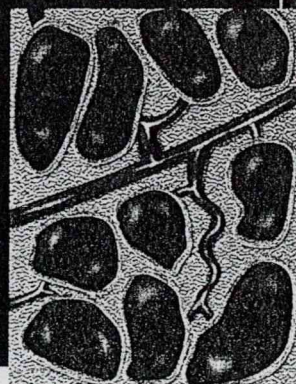
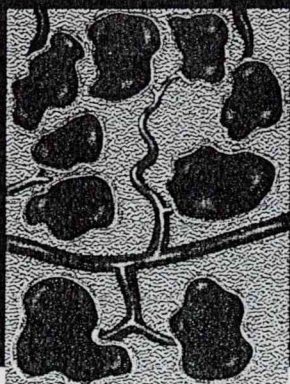
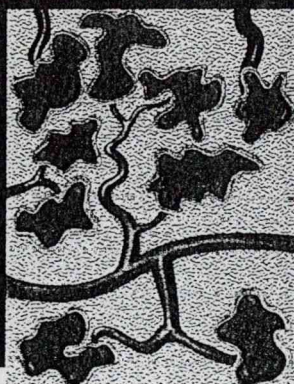
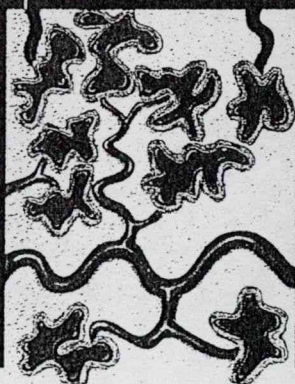
1. Agger P, Johnsen SG: Quantitative evaluation of testicular biopsies in varicocele. *Fertil Steril* 29:1974.
2. Arvis G: Varicocele et infertilité. *Progras en urologie*. 40-52:1993.
3. Charny CW: Testis biopsy: its value in male sterility. *JAMA* 115:1429-194.
4. Goldstein M: Surgery of male infertility and other scrotal disorders. In: Walsch PC: Retik AB, Stamey TA, Vaughan ED eds. *Cambell's Urology*, 6th ed. Philadelphia: WB Saunders 3-114-3149, 1992.
5. Gottschalk-Sabag S, Weiss DB, Folb-Zacharow N, Zukerman Z: Is one testicular specimen sufficient for quantitative evaluation of spermatogenesis? *Fertil Steril* 64:399-1995.
6. Hotchkiss RS: Testicular biopsy in the treatment of sterility in the male. *Bull. NY. Acad Med* 18:600-1942.
7. Ibrahim AA, Awad HA, El-Haggar S, Mitawi BA: Bileteral testicular biopsy in men with varicocele. *Fertil Steril* 38:663-1977.
8. Jarow JP: Intratesticular arterial anatomy. *J Androl* 11:255-1990.
9. Johnsen GS: Testicular Biopsy Score count - A Method for Registration of Spermatogenesis in Human Testes: Normal Values and Results in 335. *Hypogonadal. Males Hormones*, vol. 1. No 1:1-24-1970.
10. Levin HS, Thomas AJ Jr: Testicular biopsy AUA Update Series Vol 4., Lesson 13:1-1985.
11. Martin DC, Menck HR: The undescended testis: management after puberty. *J Urol* 114:77-1975.
12. Martin-du Pan RC, Campana A: Physiopathology of spermatogenic arrest. *Ferti Steri* 60:937-1993.
13. Meihard E, McRae CU, Chisholm GD: Testicular biopsy in evaluation of male infertility. *Br. Med J* 3:577-1973.
14. Papp Gy, Rajczy K, Bernárd A, Kopa Zs: A direkt sebészi spermiumnyerés (SMART) első hazai andrológiai eredményei. *Hungarian Andrology* 3:89-1998.
15. Silber SJ, Nagy Z, Devroey P, Tournaye H, Van Steirteghem AC: 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* 12: 2422-1997.
16. Skakkebak NE, Heller CG: Quantification of human seminiferous epithelium. *J Reprod Fert* 32:379-1993.

17. Schoysman R, Cassey M, Lejeune B, Segal L, Roosendaal E, Bertin G, Nijs M, Vandamme B, Vanderzwalmen P: Renewed interest in testis biopsy in the management of the azoospermic male. Magyar Andrológia 1.8.1997.
18. Tan KH, Peter H. C. Lim: Testicular biopsy & scrotal exploration in management of male infertility, Sing Med J. 32.41.1991.
19. Tournaye H, Liu J, Nagy PZ, Camus M., Groossens A., Silber S., Van Steirteghem AC and Devroey P. Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa Human Repr vol. 11.127.1996.
20. Tritto J, Giargia E, Erdei E, Morlier D. The role of testicular biopsy in microsurgical correction of bilateral varicocele. AMBER '95, Paris, Proceedings 274-278, 1995.
21. Yoshida A, Miura K, Shirai M. Evaluation of seminiferous tubule scores obtained through testicular biopsy examinations of nonobstructive azoospermic men. Fertil Steril 68.514.1997.
22. Zuckerman Z, Rodriguez-Rigau LJ, Weis DB., Chowdhury L, Smitak D, Steinberger E. Quantitative analysis of the seminiferous epithelium in human testicular biopsies, and the relation of spermatogenesis to sperm density. Fertil. Steril: 30.448.1978.

Levelezési cím:
dr. Erdei Edit
HIETE Urológiai Klinika
1135 Budapest, Szabolcs u. 33.

Erectilis dysfunctiora ...

a hatékony megoldás ...



- Különböző etiológiájú erectilis dysfunctiókban 70% feletti¹, neurogén és pszichés eredet esetén közel 100%-os sikerráta²
- Klinikailag és tudományosan dokumentált hatékonyság
- Jól tolerálható kezelés³, melynek eredményességével az esetek döntő többségében a beteg és partnere egyaránt elégedett^{4,5}

Irodalom: 1. Data on file. The Upjohn Company, Kalamazoo. 2. Hwang TI-S et al. J Urol 1989; 141: 1357-1359. 3. deKoning Gans HJ et al. Data on file. The Upjohn Company, Kalamazoo. 4. Weiske W-H. Int J Impotence Res 1990; 2 (Suppl 2): 234-235. 5. Porst H et al. VASA 1989; Suppl 28: 50-56.

Caverject

Alprostadil (PGE₁)
Injekció: 10µg, 20µg

Neurogén, vascularis, pszichés és kevert etiológiájú erectilis dysfunctio kezelésére javasolt intracavernosus öninjekciózás formájában.

Pharmacia-Upjohn

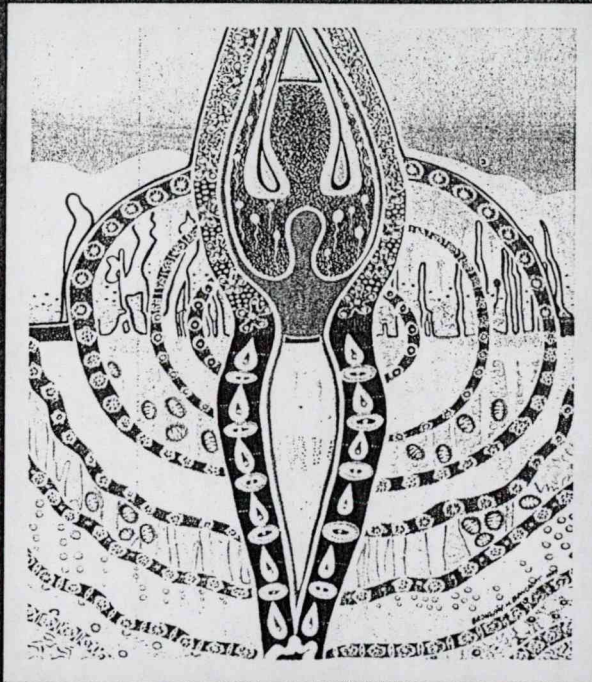
1126 Budapest, Istenehegyi út 18.
Tel.: 214-1748, 214-1749 Fax: 214-1755

PAPER VII

REPRINTED FROM:

**11th World Congress on
IN VITRO FERTILIZATION &
HUMAN REPRODUCTIVE
GENETICS**

Sydney (Australia), May 9-14, 1999



MONDUZZI EDITORE

INTERNATIONAL PROCEEDINGS DIVISION

Is the Diagnostical Testis Biopsy Important in the Age of the Assteded Reproductive Technology?

E. Erdei, É. Magyar*, J. Rózsahegyi, L. Kovács**, G. Arvis***,
S. Drávucz**** and A. Karsza

Dept. of Urology

** Dept. of Pathology*

Haynal Imre University of Budapest, Hungary

*** Dept. of Gynecology and Obstetrics*

Medical University of Szeged, Hungary/

**** Centre d'Andrologie de Paris France*

***** Dept. of Gynecology and Obstetrics*

Haynal Imre University of Budapest, Hungary

Summary

The authors have analysed the results of 97 testis biopsies. These biopsies have been carried out with the application of microsurgery, with scrotal excision, with the exposure of both testis. The results have been evaluated according to the spermogram groups. During the analysis the samples from the testis, have been compared with the FSH rates. Based on their own results and the data of the literature, they are convinced that diagnostical testis biopsy and the multiple sample method biopsy plays a vital role in the successful treatment of sever cases of male infertility.

Introduction

The basic method to analyse male infertility is the spermogram. This method however does not give a valid picture to the spermatogenesis of the testis, nor about the micro-environment that is needed for a satisfying spermatogenesis. The testis biopsy as a method is used since the late 1930s. Charny, Hotchkiss, Engle were the first pioneers of testis biopsy's analysis. The first articles issued in this field originate from them. But it's renaissance is in the age of assisted reproductive technology.

Materials And Methods

We have processed the data of 97 patients who came to our clinic due to male infertility. Their average age was 34,2 years (between 19-48). The examination was as usual: medical history, physical examination, hormonal analysis, ultrasonography and genetic exam. The spermogram groups were as follows: azoospermia -42% (41pts), OATS-19% (18pts), oligozoospermia -21% (20pts), normozoospermia -18% (18pts). The patients could be grouped as follows: varicocele -89% (89pts), other -11% (8pts). The category „other” could be grouped as follows: idiopathic azoospermia -50% (4pts), anejaculation -25% (2pts), undescended testis after orhidopexy -12,5% (1pt), undescended testis without orhidopexy and without hormone therapy -12,5% (1pt). Varicocele has been found: in the azoospermic group 37% (37pts), in the OATS group 17% (17pts), in the oligozoospermic group 17% (17pts), and in the normozoospermic group 18% (18pts). In the other category: idiopathic azoospermia 6% (4pts), anejaculation 2pts due to retrograde ejaculation where the spermogram showed oligozoospermia. (pt 1 due to diabetes; pt 2 due to spinal chord injury.) We have found undescended testis in one case with orhidopexy. The spermogram showed oligozoospermia. In the other case no hormone therapy or orhidopexy was performed, and the spermogram showed OATS. The testis biopsies were performed according to the protocol of our department: this is an atraumatic microsurgery method by scrotal exploration, where from both testis we take two biopsies usually from the inner-upper and the lower-outer surface. The closure of the testis tunica was with 6/0 Monocryl suture. The correction of the varicocele happened with a microsurgical technique, where in the first step of the operation a testis biopsy is always performed.

Table 1. Outcome of the bilateral testis biopsy in the group of azoospermia

histology	No of patients	%
complete fibrosis	1	2
complete SCOS	2	5
complete maturation arrest	3	8
3 sites without spermatogenesis	5	12
2 sites without spermatogenesis	12	30
1 site without spermatogenesis	7	15
4 sites with spermatogenesis	11	28
Total	41	100

Results

Among the azoospermic patients there was no occlusion found. Genetic exams indicated 46, XY in all cases. Among 41 azoospermic patients we found 9, (22%) with a high level of FSH. In the OATS group the same was found with 3 pts (16%). In the oligozoospermic group there was 1pt (5%) with the same FSH level, while the normozoospermic group had 1pt (6%). Even with high FSH level we found a satisfying level of spermatogenesis at least in one part of the testis. ICSI was performed later with sperm taken from this very part of the testis. We only found SCO syndrome among our patients in 2 cases. In 1 additional case we found complete testis fibrosis using diagnostical testis biopsy. Among the normozoospermic patients 95% (17pts) were found to have a involvement of the interstitium between the seminiferous tubule.

Conclusion

The four biopsy materials give a more realistic picture of the true spermatogenesis of the testis, because this process is not homogenous in the testis. With analysing our material the high level of FSH or a small testis volume can not be absolute exclusion criteria for testis biopsy. Even with a extreme level of FSH the testis can have a part where the spermatogenesis is relatively satisfying. For analysing a biopsy due to male infertility a good collaboration with the histologist and andrologist is needed. The method we propose enables a better evaluation of the surgical prognosis, or in the next step the conscious choice of the place of therapic biopsy (TESE) . In accordance with other internationally recognized authors' findings, our results prove that a significant increase in the FHS level does not mean the contraindication of the testis biopsy. We found satisfying spermatogenesis in at least one out of the four biopsies even if the FHS level was more than the double of the normal. In our oppinion, diagnostic testis biopsy should be performed before the therapy, in cases of severe male infertility. The

Table 2. Outcome of the bilateral testis biopsy in the group of OATS

histology	No of patients	%
3 sites without spermatogenesis	2	11
2 sites without spermatogenesis	6	33
1 site without spermatogenesis	3	17
4 sites with spermatogenesis	7	39
Total	18	100

results of histological analysis help to see the state of the testis more accurately and to give a prognosis about the outcome of the treatment. Our cases, supported by the data of international literature, prove that one biopsy material is not enough to evaluate the functions of the testis. Diagnostical biopsy performed in different parts of the testis, makes the basis for direct therapeutic biopsy (Table 1, 2) from those areas where spermatogenesis is the best quality for the fertilization program.

References

1. AGGER P., JOHNSEN SG: Quantitative evaluation of testicular biopsies in varicocele. *Fertil.Steril*; 29-52, 1974.
2. ARVIS G. Varicocele et infertilité. *Progres en urologie* 40-52, 1993
3. CHARNY CW. Testis biopsy: its value in male sterility. *JAMA* 115: 1429-1432, 1940.
4. GOLDSTEIN M.: Surgery of male infertility and other scrotal disorders. *Cambell's Urology*, 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; 3114-3149, 1992.
5. GOTTSCHALK-SABAG S., WEISS D.B., FOLB-ZACHAROW N., ZUKERMAN Z.: Is one testicular specimen sufficient for quantitative evaluation of spermatogenesis? *Fertil.Steri.* Vol.64.,No.2. 399-402.,1995.
6. HOTCHKISS RS.: Testicular biopsy in the treatment of sterility in the male. *Bull.Ny. Acad.Med.* 18: 600-605, 1942.
7. MARTIN-DU PAN R.C., CAMPANA A.: Physiopathology of spermatogenic arrest. *Ferti.Steri.* vol.60, No.6, 937-944, 1993.
8. SILBER S.J., NAGY Z., DEVROEY P., TOURNAYE H., VAN STEIRTEGHEM A.C.: 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.* Vol.12,no.11, 2422-2428, 1997.
9. TRITTO J., GIARGIA E., ERDEI E, MORLIER D. The role of testicular biopsy in microsurgical correction of bilateral varicocele. *AMBER'95, Paris, Proceedings* 274-278, 1995.

PAPER VIII

KÜLÖNLENYOMAT A

Magyar Nőorvosok Lapja

C. FOLYÓIRATBÓL

Magyar Nőorvosok Lapja 62, 79–85 (1999).

Genetikai szempontok a meddőség kezelésével kapcsolatban

TÓTH ANDRÁS DR.¹, ERDEI EDIT DR.²,
DRÁVUCZ SÁNDOR DR.¹, DOSZPOD JÓZSEF DR.^{1*}

*Haynal Imre Egészségtudományi Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika'
(igazgató: Doszpod József dr.), Haynal Imre Egészségtudományi Egyetem,
Urológiai Klinika' (igazgató: Karsza Attila dr.) közleménye*

Összefoglalás: Az utóbbi években számos olyan módszert (ICSI, TESA, MESA) fejlesztettek ki, amelyek jelentősen javították a meddőség kezelésének hatékonyságát. Ezeknek az eljárásoknak köszönhetően sok olyan házaspárnál is sikerült terhességet elérni, akiknél korábban ez elképzelhetetlen volt. Az asszisztált reprodukciós technikák (ART) következtében a születendő gyermek nagyobb eséllyel örökölheti a génmutációkat és a kromoszóma-rendellenességeket. Ugyancsak felmerül annak a lehetősége is, hogy a jövő generációk genetikai állományára is negatív hatással lesznek ezek az eljárások. A közleményben a szerzők az ART klinikákat felkereső házaspároknál előforduló infertilitást előidéző genetikai rendellenességekről adnak áttekintést. Hangsúlyozzák a genetikai tanácsadás és a megfelelő vizsgálatok szükségességét az ART beavatkozásokat megelőzően.

Kulcsszavak: meddőség, asszisztált reprodukció, genetika

A házaspárok 10–15%-a akaratauk ellenére gyermektelen, és ez a tény nem csak az egyén, de a populáció szempontjából sem elhanyagolható, hiszen a fejlettebb országok nagy részében – ilyen szempontból mi is ide tartozunk – a halálozások száma meghaladja a születéseket. Ez nemcsak a népesség számának csökkenéséhez, de annak kedvezőtlen koreloszlásához is vezet.

A meddőség kezelésének hatékonysága forradalmi javulást mutatott az elmúlt években, aminek következtében egyes országokban már most is eléri az összes újszülött között az asszisztált reprodukciós eljárások segítségével született gyermekek aránya az 1%-ot. Tekintettel arra, hogy ezek a beavatkozások a jövőben várhatóan még széle-

sebb körben el fognak terjedni, egyre fontosabbá válnak a felmerülő etikai és szakmai problémák.

Mivel becslések szerint a meddőség 30%-ban genetikai eredetű, az egyik legfontosabb kérdés, hogy az örökletes tényezők mennyiben befolyásolják az utód egészségét, valamint az sem elhanyagolható, hogy milyen mértékben kell számítani a populációgenetikai változásokra. A genetikai rendellenességek többsége az utód létrehozásának képtelenségével jár. A letális rendellenességek esetén a beteg nem éli meg a reprodukzív kort. Az ilyen érintett magzat már méhen belül elhal (spontán vetélés vagy halvaszületés), élveszületés esetén újszülöttkori vagy koragyermekkori halál következik be. Másik csoportba azok a betegek sorolhatók, akiknél különböző súlyos szomatikus rendellenességek fordulnak elő. Az értelmi fogyaté-

*A Szerkesztőség felkérésére készült tanulmány

kosság és a meddőség is gyakran együtt jár ezekkel a kórképekkel. Az infertilitási klinikákat elsősorban olyan betegek keresik fel, akik általános egészségi állapota nem, vagy csak viszonylag csekély mértékben szenvedett sérülést, azonban gén- vagy kromoszómaszintű károsodás miatt csökkent a termékenyítőképességük. A jelen tanulmány célja elsősorban ez utóbbi csoportba tartozó betegségek genetikai okainak áttekintése.

A nemi kromoszómák anomáliái

Női fenotípus esetén a nemi kromoszómák anomáliái általában primer ovarialis elégtelenséget, vagy az interszexualitás olyan formáit okozzák, amelyek esetében a ma ismert asszisztált reprodukciós (ART) eljárásokkal saját petesejtrel nem lehet terhességet előidézni. Bár a 45,X Turner szindrómás betegek döntő többségénél csíkgonádót lehet diagnosztizálni, néhány esetben működőképes marad a petefészek. Az ilyen esetekben létrejövő terhességekből származó magzatoknál igen nagy mértékben kell kromoszóma-rendellenességre számítani.

A 47,XXX kromoszómakészletű nők általában ép fenotípusúak, ezért a kromoszóma-anomália sokszor felderítetlen marad. A kórkép gyakran menstruációs rendellenességekkel és korai ovarialis elégtelenséggel jár. Bár a 47,XXX kromoszómakészletű nők által szült gyermekeknél a kromoszóma-rendellenességek aránya messze elmarad az elméleti 50%-tól, az emelkedett kockázat miatt feltétlenül prenatális diagnosztika javasolt.

Az azoospermiás férfiak 21,6%-ánál kromoszóma-anomália igazolható [1]. Ezek közül a leggyakoribb a *Klinefelter szindróma* (47,XXY), amely azoospermiát tehát meddőséget eredményez. A mozaik esetekben (46,XY/47,XXY), vagyis amikor ép kromoszómakészletű sejtek is előfordulnak, az azoospermia mellett súlyos oligospermiával is találkozhatunk. A Klinefelter szindrómás betegeknél a testis atrophiját az XX kromoszómát (tehát eggyel több X kromoszómát) hordozó ivarsejtek degenerációja idézi elő.

A 46,XX ép női kromoszóma készletű férfiak (*XX-férfiak*) a Klinefelter szindrómához hasonló fenotípusú betegek. A kórkép jóval ritkább, mint a Klinefelter szindróma, de így is az azoospermiások 0,6%-ánál lehet diagnosztizálni. Kialakulásában szubmikroszkópos szintű kromoszóma transzlokáció és a nem differenciálódásában részt vevő gének mutációja is szerepet játszhat [2].

Az *Y kromoszóma szerkezeti rendellenességei*

is idézhetnek elő infertilitással vagy akár a nemi differenciálódás zavarával járó problémákat [3]. Többek között a spermatogenezisért felelős géneket tartalmazó kromoszómaszakaszok deléciója okozhat azoospermiát. Azok a cytogenetikai átrendeződések is a spermatogenezis leállását eredményezhetik, amelyek a meiózisban az X és az Y kromoszóma közötti párosodást akadályozzák. Az X/Y bivalens a meiózis pachitén fázisában sex vesiculumot képez. Ilyenkor az oogenezistől eltérő módon a két nemi kromoszómán lévő gének inaktiválódnak. Amennyiben ez az inaktiváció elmarad a spermatogenezis leáll. A szerkezeti rendellenesség miatt gyakran az Y kromoszóma egyes sejtvonalakból elveszhet. Az így létrejövő 45,X kariotípusú sejtek arányától függően a Turner-szindróma fenotípusa is kialakulhat.

Szomatikus kromoszóma-rendellenességek

Míg az azoospermiás betegek esetében elsősorban a nemi kromoszómák eltéréseire számíthatunk, addig az oligospermiás férfiaknál az autoszómák szerkezeti rendellenességei fordulnak elő gyakrabban. Az oligospermiás férfiak 6–7%-ánál állapítottak meg kromoszóma-rendellenességet, ebből a *Robertson transzlokációk* 2%-ban fordulnak elő. A homológ kromoszómák transzlokációjakor (mint pl. a 13/13 vagy a 21/21) *elvéleg sem várható egészséges utód. In't Veld és mtsai* [4] egy olyan 13/13 transzlokációs férfiról számolnak be, aki 10 éves vizsgálatsorozat után került ICSI-re. Természetesen a beavatkozás eredménytelen maradt. Azokban az esetekben, amikor a 21-es kromoszóma is érintett (például 13/21-es transzlokáció), a magzat Down szindrómájára is számítani kell. A Robertson transzlokációk többségét (1,6%) a 13/14-es kromoszómákat érintő átrendeződések képezik. Ezeknek a kromoszóma-átrendeződéseknek a hatása igen változó – egyeseknél kisebb mértékben csökkenti a fertilitást, míg *Conn és mtsai* [5] olyan esetekről számolnak be, akiknél az ICSI-vel megtermékenyített pre-embriók 87%-ában kromoszóma-anomália fordult elő. A meiózis során a transzlokációs kromoszómák az X/Y bivalenssel asszociálódhatnak, ami a spermatogenezis károsodását idézheti elő [6].

A szerkezeti kromoszómaátrendeződések között a *reciprok transzlokációk* jelentős szerepet játszanak, mivel újszülöttkorban 1/500 az előfordulásuk [7]. A rendellenesség eredményeként gyakran csökkent fertilitásra kell számítani.

Amennyiben olyan kombinációban adódnak át az utódba a transzlokációk, hogy a DNS mennyisége is megváltozik (kiegyensúlyozatlan kromoszómaátrendeződés) spontán vetélés és/vagy a magzat fejlődési rendellenessége a következmény. A transzlokációt hordozó férfiak spermiumaiban a kiegyensúlyozatlan genetikai állomány előfordulása a transzlokáció típusától függően 18,5 és 77% között ingadozik [8]. A kromoszómaszegregáció módját jelentősen befolyásolja a transzlokálódott kromoszómaszakaszok mérete. Az ivarsejtek kezdeti vizsgálataira utalnak, hogy a prezigotikus szelekció kisebb mértékű, míg a rendellenességek szelekciója posztzigotikus időszakban, tehát a terhesség alatt, rendkívül erősen működik. Az újszülöttnél már csak átlagosan 10% a kromoszómaátrendeződések fejlődési rendellenességet okozó kiegyensúlyozatlan kombinációinak az előfordulása.

A kromoszómák egyes szakaszainak *inverziója* általában kisebb hatással van a fertilitásra. Kivételnek az 1-es kromoszóma inverziója látszik, amely a törésponttól függetlenül gyakran a spermatogenezis károsodását idézi elő [9, 10]. Az ilyen betegek meióziséban gyakran a szinapszisképzés zavarát figyelték meg.

Molekuláris genetikai szintű károsodások

A genetikai vizsgálóeszközök fejlődésével az infertilitási klinikákat felkeresők között egyre nagyobb számban találunk olyan betegeket, akiknél molekuláris genetikai módszerekkel mutációkat mutattak ki [11]. Még nem rendelkezünk megfelelő populációs szintű adatokkal a különböző meddőséget vagy csökkent termékenységet előidéző mutációk előfordulására vonatkozóan, de nyilvánvaló, hogy ezek közül legnagyobb jelentőségűek az AZF régióhoz tartozó mikrodeléciók [12]. Az AZF rövidítés az azoospermia faktorból adódik. A genetikai szabályozás bonyolultságát mutatja, hogy az Y kromoszóma AZF régiójában eddig 118 mikrodeléciót mutattak ki. Ezeknek a mutációknak a spermatogenezis mechanizmusára gyakorolt hatása még nem minden esetben ismert pontosan. *Vogt* [13] az Y kromoszóma három régióját *AZF a, b és c*-nek nevezte el. Az *AZFb* régióban az *RBM* (RNA binding Motif) géncsalád mintegy 50 génből áll. A második géncsalád a *DAZ* elnevezést kapta és az *AZFc* régióban található. A *DAZ*-t először egy génnek vélték, azonban később kiderült, hogy számos

gént foglal magába. Mindkét géncsalád hasonló struktúrájú fehérjéket kódol. Ezeknek a fehérjéknek elsősorban az ivarsejtek érésében szerepet játszó RNS metabolizmusban lehet szerepük. *Vogt* [13] az azoospermias és súlyos oligospermias betegek között 6%-ban igazolta valamelyik *AZF* csoportba tartozó gén mutációját. Az *AZF* régióban még több géncsaládot is találtak. Így például az *SPGY*-t, vagy a *cyelin* géneket, amelyek a spermatogenezis különböző fázisaiban a proliferációt irányítják.

Az ivarsejtek érésében nemcsak az Y kromoszómán, hanem a 3-as kromoszómán lokalizált gének is részt vesznek [14]. Ezekben az esetekben természetesen autoszómális recesszív öröklődéssel kell számolni.

A *Sertoli cell only szindróma* (SCOS) a nemobstruktív azoospermias betegek 30%-ánál állapítható meg. A kórképre az ivarsejtek teljes hiánya, kis testis és a magas FSH érték jellemző. *Foresta és mtsai* [15] az idiopathiás SCOS betegek 55%-ánál igazoltak genetikai elváltozásokat. A kórkép pathogenezise nem ismert pontosan, de a csírasejtek teljes hiánya premeiotikus károsodásokra utal. Az SCOS betegeknél az *AZF* csoportba tartozó gének mutációit (mikrodelécióit) igazolták. Ugyanezeket az elváltozásokat a meddő férfiak apjánál és fiútestvéreinél már nem tudták kimutatni, így egyértelműnek látszik az összefüggés a genetikai mutációk és a kórkép között. A szerzők vizsgálataik során azt is megállapították, hogy az SCOS mikrodeléciók ill. azon formái, amikor eddig nem találtak genetikai elváltozást, klinikailag nem különíthetők el. Ennek alapján feltételezik, hogy csak idő kérdése a negatív esetekben is a mutációk azonosítása, ezért minden bizonnyal a genetikai tényezők 55%-nál nagyobb mértékben játszanak szerepet a betegség kialakulásában.

Az epididymisben lejátszódó érési folyamatok teszik képessé a spermiumot arra, hogy felismerje a petesejtet (kapacitálás) és át tudjanak hatolni a zona pellucidán, valamint fuzionáljanak a vitellussal (akroszóma reakció). A *cisztikus fibrózist* (CF) előidéző gén mutációja legérzékenyebben az epididymis és a vas deferens kialakulását érinti, így sok esetben a betegség enyhe megnyilvánulása mellett, vagy heterozigóta formában is bekövetkezhetnek meddőséget okozó kóros elváltozások [16, 40]. A cisztikus fibrózis súlyos formáiban szenvedő betegek várható túlélési ideje is ma már az orvostudomány fejlődésének köszönhetően átlagosan 25–30 év. Hazánkban ez a leggyakoribb autoszómális recesszív módon öröklődő be-

tegség – minden 25-dik ember heterozigóta formában hordozza a betegséget okozó gént. A gén egyrészt a sejtmembrán klorid-ion transzportjában kulcs fontosságú fehérjét kódol, másrészt szerepet játszik az ejakulációs csatorna, a semminális vesiculum, a vas deferens és az epididymis distalis kétharmadának a kialakításában is. Az azoospermias férfiak 2%-ánál diagnosztizálható a vas deferens kétoldali veleszületett hiánya. Az epididymis kialakulása esetén is a gén károsan befolyásolja az epididymis elektrolit transzportját, aminek következtében az oligospermias betegek között is gyakran diagnosztizálható ez a mutáció.

A spermium farkának, valamint a csillók mozgását mintegy 100 fehérje segíti elő. Minden fehérje szintézise genetikai kontroll alatt áll. Közülük eddig a dynein hiányát sikerült kimutatni. A kórképet *Kartagener szindrómának* nevezik. Gyakran a spermiumok mozgásképtelensége miatt meddőséggel jár. Esetenként a nőknél is okozhat termékenységi problémákat, mivel a petesejtek továbbításában a csillómozgásnak fontos szerepe van. A betegség heterogén kóreredete és a meddőség ténye miatt nehéz az öröklési módot meghatározni. Leggyakrabban autoszómális recesszív, de esetenként autoszómális domináns és X-hez kötött formát is valószínűsítenek.

A megtermékenyítés folyamatát is számos genetikailag determinált fehérje biztosítja. Ere példa a külső acrosomális membránban az *acrosin hiánya*, aminek következtében általában kerek fejűek a spermiumok, és a megtermékenyítés nem jön létre. Ilyen esetekben is a sterilítás miatt az öröklési mód nehezen dönthető el.

Számos súlyos genetikai betegséget ismerünk (például Leber hereditár optikus neuropátia, mitokondriális myopathia, Leigh kór), amelyek a *mitokondriális DNS* (mtDNS) mutációi következtében jönnek létre. Az évmilliók során az evolúció révén úgy alakult, hogy a megtermékenyítés közben a spermiumban lévő mitokondriumok nem kerülnek a petesejtbe, így a mitokondriális betegségek anyai átvörözöttségűek. Az ICSI során az apai eredetű mitokondriumok is a petesejtbe kerülnek, ami által az mtDNS-re nézve kimérák jönnek létre. Az öröklési mód megváltoztatásának gyakorlati következményei még nem ismertek.

Az *androgén érzéketlenség* miatt gyakran a 46.XY kromoszómakészlet ellenére női fenotípus alakul ki. A betegség inkomplett formái azonban változatos következménnyel, többek között ép férfi fenotípussal is járhatnak. Egyes feltételezések szerint az idiopathiás férfi infertilitás okaként 40%-ban tehető felelőssé ez a mutáció [17].

Az ivarsejtek genetikai károsodásai

Közvetlenül az ivarsejtek genetikai vizsgálatai rendkívül hasznos információkkal szolgálnak a különböző genetikai rendellenességek előfordulásáról a meiózis, illetve a meiózis utáni fázisokban. Először az aranyhőrcsög pete penetrációs teszttel [18], majd a molekuláris citogenetikai módszerek (fluoreszcens in situ hibridizáció – FISH) felhasználásával vizsgálták a spermiumokat [19, 20]. Normospermias férfiak spermiumaiban 6,3% az összes kromoszóma-anomália átlagos előfordulása [21]. A kromoszóma-anomáliák és a kóros spermiumok között nincs közvetlen összefüggés, így csak a spermium morfológiája alapján nem kapunk információt a genetikai károsodásokra vonatkozóan [22].

A mozaik Klinefelter (47,XXY/46,XY) szindrómás és a 47,XYY kariotípusú férfiak ép morfológiájú érett spermiumaiban az XXY kromoszómakészlet esetén 2,5%, az XYY mellett pedig 8,6% a nemi kromoszóma-anomáliák aránya [23]. Ez az eredmény ugyan emelkedett a kontrollhoz képest, de a spermatogenezis során ható erőteljes szelekciót jelez. A 47,XYY kariotípusú betegek spermatocitái között viszont a 24,XY kromoszóma készlet aránya jóval magasabb (78%), tehát ha ezekkel a spermatocitákkal történik a megtermékenyítés, akkor ilyen magas arányban kell az utód Klinefelter szindrómájára számítani [24, 25]. A spermiumok vizsgálataival azt is igazolták, hogy a kromoszóma-anomáliák előfordulását nem vagy csak átmenetileg emelik a testikuláris tumorok miatti kemoterápiás kezelések [26]. Így, legalábbis a kezelések mutagén hatására hivatkozva, teljesen indokolatlan asszisztált reprodukciós eljárást végzni.

A pre-embriók genetikai vizsgálatai

Egyes szerzők szerint a korai embriók morfológiája és a kromoszóma-rendellenességek között összefüggés mutatható ki. Ezt látszanak alátámasztani azok a felmérések, amelyek során a morfológiailag rendellenes embriókban nagyobb arányban találtak kromoszóma-rendellenességet mint az épnek látszók között [27, 28]. A legtöbb számbeli kromoszóma-rendellenesség (aneuploidia) esetén azonban az embrió 8 sejtés stádiumig normálisan fejlődik, ami azzal magyarázható,

hogy az embrionális genom csak ezután válik aktívvá [29]. *Gianaroli és mtsai* [30] 50 morfológiailag ép visszaültetésre alkalmas embrió közül 24-nél állapított meg kromoszóma-rendellenességet. Tekintettel arra, hogy ezek az anomáliák általában korai magzati veszteséget eredményeznek, jelentősen befolyásolják az asszisztált reprodukciós eljárások sikerességét. A szerzők 40%-os terhességi arányt értek el abban a csoportban, ahol preimplantációs genetikai vizsgálat segítségével kiszűrték a citogenetikai eltéréseket. Ez az arány a kontrollcsoportban csak 23% volt.

A multinukleált zigótákról viszont már morfológiai alapon is egyértelműen meg lehet állapítani a többszörös (poliploid) kromoszómakészletet. Az ilyen embriók ritkábban polispermia következtében jönnek létre. A legtöbb poliploid embrió a megtermékenyítéskor csak két pronukleuszt tartalmaz, tehát nem polispermia eredményei. Ebből adódik, hogy az első sejtosztódások során alakul ki a többszörös kromoszómakészlet. A genetikai állomány változása a megtermékenyítés után igen gyakran észlelhető, így például *Kligman és mtsai* [31] szerint a megtermékenyítés utáni 2–3-dik napon észlelt multinukleált zigótákban a kromoszómamozzaikosságok aránya jóval nagyobb (76%), míg a 4-dik nap után létrejövő multinukleált sejtek többnyire mozaik formában fordulnak elő. Ez utóbbiakból rendszerint ép kromoszómakészletű embriók fejlődnek. A genetikailag rendellenes sejtek arányának az egyedfejlődés alatti jelentős változásában a természetes szelekció fontos szerepet játszik. Erre utal az is, hogy a továbbfejlődni nem képes embriók döntő többségében poliploiditást lehet diagnosztizálni.

A felmérések szerint az embriók kezelésének körülményei is jelentős mértékben befolyásolják a kromoszóma-anomáliák előfordulását [32].

Következtetések

Az infertilitás mintegy 30%-át genetikai károsodások idézik elő [33]. A genetikai tényezők hatását alábecsülik, aminek az egyik oka az, hogy a jelen gyakorlat szerint a beavatkozások előtt általában semmilyen genetikai vizsgálat nem történik. Ez azért is érthetetlen mert a genetikai vizsgálatok már évtizedekkel ezelőtt is a meddőség kivizsgálásának szerves részét képezték [37]. A másik tényező pedig az, hogy újszülöttkorban csak az ART miatt nagyobb eséllyel bekövetkező rendellenességek kisebb része észlelhető. Ilyenek például a kromoszóma-rendellenességek és a cisztikus

fibrózis. A genetikai károsodások nagyobbik része kevesebb szomatikus eltéréssel infertilitást okoz, aminek jelenléte csak felnőttkorban válik nyilvánvalóvá. Az X-kromoszómához kötött betegségek mutációi két generációval később nyilvánulhatnak meg. Így például az androgén érzéketlenség, a születendő lánygyermek közvetítésével a következő generáció fiú utódainál (az ICSI-vel kezelt unokájánál) idézhet elő rendellenességet, mégpedig ugyanaz a gén nemcsak férfi meddőséget, de a komplett teszikuláris feminizációt is előidézhethet [34].

A meddőségi kezelések előtti kivizsgálások részeként tehát feltétlenül genetikai tanácsadásra van szükség [38]. A genetikai tanácsadás során a már rendelkezésre álló klinikai és laboratóriumi adatok alapján eldönthető milyen vizsgálatok indokoltak. Számos olyan genetikai betegség, szindróma ismert, amelyek enyhébb formái kellő kivizsgálás hiányában felderíthetetlenek maradnak, és mivel a genetikai betegségek elsősorban a termékenyítőképeséget károsítják [11] az ART-re kerülő betegeknek nagyobb arányban kell rájuk számítani. Az ART segítségével az utódba átjuttatott génmutáció már sokkal súlyosabb formában is megnyilvánulhat. A genetikai vizsgálatok közül leggyakrabban a perifériás vér limfocitáinak kromoszóma-analízise szerepel. Így például Németországban minden ICSI kezelésben részesülő házaspárnál, függetlenül az indikációtól, kötelező a citogenetikai vizsgálatot elvégezni [39]. Véleményünk szerint a nyilvánvalóan nem genetikai eredetű meddőség esetén erre nincs feltétlenül szükség. További genetikai vizsgálatok lehetnek még a testikuláris biopsziát követően a spermatogenezis tanulmányozása, meiózis analízise és esetenként az ivarsejtek citogenetikai kiértékelése. A kivizsgálás fontos része lehet a limfociták vagy a spermatozoák DNS-analízise elsősorban a spermatogenezist befolyásoló AZF mikrodeleciók diagnosztizálása céljából. *Kremer és mtsai* [35] felmérései szerint az andrológiai és hormonális paraméterek segítségével lehetőség adódik arra, hogy 20% eséllyel találjanak AZF mikrodeleciót a betegeknek, amivel gazdaságossá tehető a genetikai vizsgálat. Ma Magyarországon ezen gének DNS analízise még nem lehetséges, bevezetésük mielőbb indokolt lenne. Az anamnézistől függően esetenként más speciális genetikai vizsgálatokra is sor kerülhet. A vas deferens hiánya miatt végzett ICSI beavatkozások előtt fontos, hogy DNS-analízissel megpróbáljuk analizálni a CF gén mutációját is. Pozitív eredmény esetén ugyanezt a feleségnél is fontos elvégezni, mivel az ő génhordo-

zósága esetén a magzati CF-re 25%-ban kell számítani ha a férj heterozigóta. Ez az arány 50%-ra emelkedik, ha a férj homozigóta. Ilyenkor meggondolandó, hogy az ICSI-t a férj spermiumaival elvégezzék.

Az androgén gén mutációinak molekuláris szűrése még kutatási fázisban van, ezért a rutin genetikai vizsgálatok között jelenleg nem végezhető.

A szerkezeti kromoszóma-rendellenességek oligospermiát vagy azoospermiát előidézve a spermatogenezist gyakrabban károsítják mint az oogenezist, ezért a transzlokációt hordozó férfiaknál nagyobb arányban észlelünk csökkent termékenységet, mint a nőknél. Emiatt kisebb az esélye annak, hogy az anomália miatt fejlődési rendellenességgel sújtott gyermek szülessen. Férfiak esetében tehát maga a meddőség a fejlődési rendellenesség elleni szelekciós tényező. Azokban az esetekben amikor mégis létrejön a megtermékenyítés a zona pellucida nem hat szelekciós tényezőként a kromoszóma-mutációkkal szemben, így azok a spermiumok, amelyek káros kromoszómakészletek, függetlenül a megtermékenyítési módszerektől, nem változtatják meg a fertilitási arányt.

Ma már az ICSI és más eljárásokkal kiiktathatjuk a meddőséget mint szelekciós hatást. Ennek veszélye különösen a spermatogenezist, a spermiumok érését, motilitását és közvetlenül a megtermékenyítést irányító génmutációk esetében nagy. Az Y kromoszómán lokalizált gének (pl. az AZF) esetében egyértelmű, hogy a mutáció a fiú utódba is átkerül és szintén meddőséget idéz elő. Az autoszómákon lévő mutáns gének következményei az öröklődési módtól függenek. A spermatogenezist károsító kromoszóma-rendellenességek előfordulásakor szintén megnő a valószínűsége annak, hogy rendellenes genetikai állományú spermiummal idézzük elő a megtermékenyítést. Ilyenkor emelkedik a magzati rendellenességek aránya [36], ami spontán vetélés (tehát az ICSI szempontjából mint sikertelen beavatkozás), és fejlődési rendellenességgel született gyermekek formájában fog megjelenni.

Fontos tehát az érintett házaspárokat tájékoztatni a genetikai diagnózisról, annak következményeiről, valamint a megoldási lehetőségekről. Azokban a ritka esetekben, amikor a kromoszóma transzlokáció típusa miatt elvileg sem születhet egészséges gyermek, nyilván más megoldást (pl. heterológ inszeminációt) kell választani. Amikor „csak” a magzat fejlődési rendellenességének esélye nagyobb, prenatális genetikai vizsgálatra lehet szükség. Mivel ma még nem elterjedt a pre-

implantációs genetika, pozitív eredmény esetén a terhesség megszakítása merülhet fel. A házaspároknak döntésük meghozatalakor ezt is mérlegelni kell.

Irodalom

- [1] De Bruckeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991; 6:245-250.
- [2] Ferguson-Smith MA, Cooke A, Affara N et al. Genotype-phenotype correlations in XX males and the bearing on current theories of sex determination. *Hum Genet* 1990; 84:198-202.
- [3] Tóth A, Gaál M, László J. Familial pericentric inversion of the Y chromosome. *Ann Génét* 1984; 27:60-1.
- [4] In't Veld PA, Weber RFA, Los FJ, den Hollander N, Dhont M, Pieters MHEC, Van Hemel JO. Two cases of Robertsonian translocations in oligozoospermic males and their consequences for pregnancies induced by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997; 12:1642-1644.
- [5] Conn CM, Harper JC, Winston RML, Delhanty JDA. Infertile couples with Robertsonian translocations: preimplantation genetic analysis of embryos reveals chaotic cleavage divisions. *Hum Gen* 1998; 102: 117-123.
- [6] Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I. Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod* 1996; 11:1-26.
- [7] Jacobs PA. Epidemiology of chromosome abnormalities in man. *Am J Epidemiol* 1977; 105:180-191.
- [8] Pellestor F, Girardet A, Coignet L, Andréo B, Lefort G, Charlier JP. Cytogenetic analysis of meiotic segregation in sperm from two males heterozygous for reciprocal translocations using PRINS and hamster techniques. *Cytogenet Cell Genet* 1997; 78:202-208.
- [9] Tóth A, Gaál M, Sára Gy, László J. Pericentric inversion of chromosome 1 in an azoospermic man. *J Med Genet* 1982; 19:303-305.
- [10] Chandley AC, McBeath S, Speed RM et al. Pericentric inversion in human chromosome 1 and the risk of male sterility. *J Med Genet* 1987; 24: 325-334.
- [11] Vogt PH. Molecular basis of male infertility. *Int J Androl* 1997; 20: Suppl. 3, 2-10.
- [12] Girardi SK, Michnik A, Schlegel PN. Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men. *Hum Reprod* 1997; 12:1635-1641.
- [13] Vogt PH. Genetic aspects of artificial fertilization. *Hum Reprod* 1995; 10:128-137.
- [14] Schoum E, Barbaux S, Bourgeron T és mtsai. Gene sequence, localization and evolutionary conservation of DAZLA, a candidate male sterility gene. *Genomics* 1997; 41:227-235.
- [15] Foresta C, Ferlin A, Garolla A, Moro E, Pistorello M, Barbaux S, Rossato M. High frequency of well-defined Y-chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome. *Hum Reprod* 1998; 13:302-307.
- [16] Wong PYD. CFTR gene and male fertility. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 107-110.
- [17] Aiman J, Griffin JE. The frequency of androgen recep-

- tor deficiency in infertile men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1982; 54: 223–227.
- [18] Rudak E, Jacobs PA, Yanagimachi L. Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature* 1978; 274:911–913.
- [19] Girardet A, Coignet L, Andréo B, Lefort G, Charlier JP, Pellestor F. Aneuploidy detection in human sperm nuclei using PRINS technique. *Am J Med Genet* 1996; 64:488–492.
- [20] Bernardini L, Martini E, Geraedts JPM, Hopman AHN, Lanteri S, Conte N, Capitano GL. Comparison of gonosomal aneuploidy in spermatozoa of normal fertile men and those with severe male factor detected by in situ hybridization. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 431–438.
- [21] Downie SE, Flaherty SP, Matthews CD. Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod* 1997; 3:585–598.
- [22] Guttenbach M, Martinez-expósito MJ, Michelmann HW és mtsai. Incidence of diploid and disomic sperm nuclei in 45 infertile men. *Hum Reprod* 1997; 12: 468–473.
- [23] Martini E, Geraedts JPM, Liebaers I, Land JA, Capitano GL, Ramaekers FCS, Hopman AHN. Constitution of semen samples from XYY and XXY males as analysed by in situ hybridization. *Hum Reprod* 1996; 11:1638–1643.
- [24] Mennicke K, Diercks P, Schlieker H, Bals-Pratsch M, Al Hasani S, Diedrich K, Schwinger E. Molecular cytogenetic diagnostics in sperm. *Int J Androl* 1997; suppl 3, 11–19.
- [25] Blanco J, Rubio C, Simon C, Egozcue J, Vidal F. Increased incidence of disomic sperm nuclei in a 47,XYY male assessed by fluorescent in situ hybridization (FISH). *Hum Genet* 1997; 99:413–416.
- [26] Martin RH, Ernst S, Rademaker A és mtsai. Chromosomal abnormalities in sperm from testicular cancer patients before and after chemotherapy. *Hum Genet* 1997; 99:214–218.
- [27] Plachot M, Junca AM, Mandelbaum J, De Grouchy J, Salat-Baroux J, Cohen J. Chromosome investigations in early life II. Human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1987; 2:29–35.
- [28] Pellestor F, Dufour MC, Arnal F, Humeau C. Direct assessment of the rate of chromosomal abnormalities in grade IV human embryos produced by in-vitro fertilization procedure. *Hum Reprod* 1994; 9:293–302.
- [29] Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995; 64:382–391.
- [30] Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fiorentino A, Garrisi J, Munné S. Preimplantation genetic diagnosis increases the implication rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. *Fertil Steril* 1997; 68:1128–1132.
- [31] Kligman I, Benadiva C, Alikani M, Munné S. The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities. *Hum Reprod* 1996; 11:1492–1498.
- [32] Munné S, Magli C, Adler A, Wright G, de Boer K, Mrtimer D, Tucker M, Cohen J, Gianaroli L. Treatment-related chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod* 1997; 12:780–784.
- [33] Vogt PH. Genetic disorders of human spermatogenesis. Current advances in andrology. *Proc. VI th Intern. Congr of Androl. Salzburg* 1997.
- [34] Johnson MD. Genetic risk of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. *Fertil Steril* 1998; 70:397–411.
- [35] Kremer JAM, Tuerling JHAM, Meuleman AH és mtsai. Microdeletions of the Y chromosome and intracytoplasmic sperm injections: from gene to clinic. *Hum Reprod* 1997; 12:687–691.
- [36] Lange R, Michelmann HW, Engel W et al. Chromosome Ursachen der Infertilität beim Mann. *Fertilität* 1990; 6:17–28.
- [37] László J. A meddő házasság genetikai háttere. *Magyar Nőorv L.* 1979; 42:62–67.
- [38] Lawler AM, Gearhart JD. Genetic counseling for patients who will be undergoing treatment with assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 1998; 70:412–413.
- [39] Scholtes MCW, Berhend C és mtsai. Chromosomal aberrations in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection: influence on implantation and ongoing pregnancy rates. *Fertil Steril* 1998; 70:933–937.
- [40] Laribba S, Bassas L és mtsai. Testicular CFTR splice variants in patients with congenital absence of the vas deferens. *Hum Mol Genet* 1998; 7:1739–1744.

Tóth A, Erdei E, Drávucz S, Doszpod J. *Genetic points of view in case of infertility treatment*

Recently a lot of techniques (ICSI, TESA, MESA) have been developed to increase the efficacy of infertility treatments. These procedures give a previously unavailable possibility for couples to achieve pregnancy. However, the use of assisted reproduction techniques (ART) for the treatment of infertility may result in the transmission of genetic mutations and chromosomal anomalies in the offsprings, and it has a possible negative consequences for the genetic constitution of the human population in the future generations. This review presents an overview of genetic disorders associated with infertility at couples attending ART clinics. It is emphasized that genetic counselling and appropriate investigations should be performed before ART procedures.

Key words: infertility, assisted reproduction, genetics

Közlésre elfogadva: 1998. október 25.

PAPER IX

35 | S2 | 99

Released March 1999
ISSN 0302-2838
35(suppl 2) 1-196 (1999)

Supplement for subscribers free of charge

European Urology

Official Journal of the

EAU

European Association
of Urology



EORTC

European Organization
for Research and Treatment
of Cancer –
Genito-Urinary Group



ESUOE

European Society
for Urological Oncology
and Endocrinology

XIVth Congress of the European Association of Urology

April 7–11, 1999, Stockholm

Editors:

Members of the Scientific Committee of the XIVth EAU Congress:

P. Alken, Mannheim
W. Artibani, Modena
L. Boccon-Gibod, Paris
J. Breza, Bratislava
C. Chapple, Sheffield
J.-E. Damber, Umeå
F. Debruyne, Nijmegen
P. Ekman, Stockholm

A.-C. Kinn, Stockholm
R. Kirby, London
P. Puppo, Genova
C. Schulman, Brussels
E. Solsona, Valencia
U. Studer, Bern
P. Van Cangh, Brussels

S. Karger
Medical and Scientific
Publishers
Basel · Freiburg
Paris · London
New York · New Delhi
Bangkok · Singapore
Tokyo · Sydney

KARGER

INLAY-ONLAY FLAP URETHROPLASTY IN THE ABSENCE OF A URETHRAL SEGMENT

Kočvara Radim, Dvořáček Jan

Department of Urology, General University Hospital, 1st Medical School and Postgraduate Medical School, Prague, Czech Republic

OBJECTIVES: The absence of a segment of the urethra renders the onlay urethroplasty impossible. A modified technique is presented to avoid the tubularized flap associated with a higher complication rates.

MATERIAL AND METHODS: Schematic pictures and surgical videorecording of the inlay-onlay urethroplasty in a 22-year old man are presented. Previous failed reconstruction for the urethral stricture lead to perineal urethrostomy with urethral openings 6 cm apart. Scarred and hair-bearing perineal tissue was unusable for urethral reconstruction. An asymmetrical wider part of the preputial flap was inserted between the two mobilised urethral stumps and anastomosed to them with two continuous hockey stick suture lines. With this manoeuvre the continuity of the urethra was restored and the urethra was then completed with standard onlay overlapping of the flap.

RESULTS: Postoperative course was uneventful, 18 months later normal uroflowmetric parameters could be assessed. Until now this technique has been used in 30 patients with a complex urethral stricture or hypospadias, 3 (10%) permanent complications have been encountered. In another 9 patients the combined tube-onlay flap was used with higher complication rate (44%).

CONCLUSIONS: Inlay-onlay urethroplasty may replace the tubularized island flap procedure or the two-stage repair in patients with a missing urethral segment. The depicted technique is easier to perform and had low complication rates.

V43

EPIDIDYMAL SPERM ASPIRATION FOR OBSTRUCTIVE AZOOSPERMIA BY USING A MICROPUNCTURE TECHNIQUE

Hibi Hatsuaki, Yamamda Yoshiaki, Honda Nobuaki, Fukatsu Hidetoshi
Department of Urology, Aichi Medical University, Nagakute, Japan

Yamamoto Masanori
Division of Urology, International University of Health and Welfare, Tochigi, Japan

Asada Yoshimasa
Nakajima Clinic, Aichi, Japan

INTRODUCTION AND OBJECTIVES: We have developed a new sperm collection method by epididymal micropuncture to obtain uncontaminated spermatozoa for ICSI for patients with obstructive azoospermia. We show the technique of epididymal micropuncture.

MATERIALS AND METHODS: Under local anaesthesia, the testis and epididymis were exposed through scrotal incision, and stabilised in a testicular holder with the aid of 2% agar. The epididymal micropuncture was performed using a micropipette placed in a micromanipulator. Aspirated spermatozoa were supplied for ICSI.

RESULTS: The volume of epididymal fluid obtained 12 to 980 µl (mean 91 µl). Sperm concentration ranged from 0.1 to 269 million (mean 44 million). Sperm motility ranged from 0.1% to 80%. In 1997, a clinical pregnancy rate of about 50% was achieved.

CONCLUSIONS: Our epididymal micropuncture technique is atraumatic, uncontaminated, easily sealed and ensures the possibility of future repeated puncture attempts.

THE ROLE OF MICROSURGERY IN THE TREATMENT OF VARICOCELE

E. Erdci¹, J. Tritto², A. Laki¹, G. Arvis², J. Rózsahegy¹, A. Karsza¹, M-O North²

"Haynal Imre" University of Health Science, Department of Urology, Budapest, Hungary¹; Centre d'Andrologie de Paris, Paris, France²

INTRODUCTION AND OBJECTIVES: Varicocele is found in approximately 15 per cent of the general male population. Different studies have demonstrated that it is associated with a progressive and duration dependent decline in testicular function.

The association of varicoceles and male infertility has been well documented.

MATERIAL AND METHODS: The authors reported of their experiences of 237 varicocele operations (32% uni, 68% bilateral) associated with testicular biopsy. The correction of these lesions is an important therapeutic procedure for many infertile men. The authors introduce their new techniques for varicocele, including microsurgery. A subinguinal approach is presented for correction of varicoceles which combines microdissection of the spermatic cord. This method has several advantages.

RESULTS: Complication is 3/237 (2 inflammations, 1 hydrocele). The amelioration of spermiogram depends, that the varicocele associated with obstruction or not.

CONCLUSION: The incidence of complications can be reduced by employing microsurgical techniques and on a long term this method proves to be the most successful with infertile men.

V44

LA PEYRONIE DISEASE: CORPOROPLASTY USING VENOUS PATCH

Zucchi Alessandro, Mearini Ettore, Mearini Luigi, Vivacqua Carlo, Salomone Umberto, Porena Massimo

Urology Department, University of Perugia - Italy

In corporoplasty with autologous material the plaque is usually excised and a graft inserted. Results in terms of conserved potency are good and post-operative morbidity is minimal. The ideal patch should have important features as flexibility, availability, low cost, rapidity of healing and good tissue acceptance. Venous tissue appears to have all these requisites. Technically in corporoplasty full plaque excision, which requires a large graft patch, is not always necessary. In fact results overlap with those of plaque incision which not only reduces tunica albuginea traction but also requires a much smaller graft patch. We describe a technique which combines plaque incision with a autologous graft. After degloving, a transversal cavernotomy on to the plaque is performed to obtain complete sectioning of the fibrotic tissue and landmarks are placed on incision margins. 10 cm of saphenous vein are isolated and detubularized and placed on the tunica albuginea defect with the endothelial side towards the cavernous tissue. Interrupted sutures of polyglycolic acid are used to anchor the venous patch graft. After the evaluation of residual curvature, if the graft is unable to straighten the penis, plication with non-absorbable sutures in the contralateral corpus may be necessary. The technique is easy and quick. The autologous material is readily available and elastic enough to support erectile tissue tension. The patch can be modelled to the different forms required without any great difficulty, but one important point to bear in mind is that the vein graft should be wide enough to avoid retraction which occurs after isolation. After this type of surgery we recommend using a vacuum device for several months to ensure cavernosal rehabilitation.

THE ROLE OF MICROSURGERY IN THE TREATMENT OF VARICOCELE

E. ERDEI, J. TRITTO, A. LAKI, G. ARVIS, J. RÓZSAHEGYI, A.KARSA, M.-O. NORTH

**Haynal Imre University of Health Sciences, dept. of Urology, Budapest, Hungary and
Centre d'Andrologie de Paris, Paris, France**

INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Varicocele is found in approximately 15 per cent of the general male population. Different studies have demonstrated that it is associated with a progressive and duration-dependent decline in testicular function. The association of varicocele and male infertility has been well documented.

MATERIAL AND METHODS

The authors reported of their experiences of 237 varicocele operations (32% uni, 68% bilateral) associated with testicular biopsy. The correction of these lesion is an important therapeutic procedure for many infertile men. The authors introduce their new techniques for varicocele, including microsurgery. A subinguinal approach is presented for correction of varicocele which combines microdissection of the spermatic cord. This method has several advantages.

RESULTS

Complication is 3/237 (2 inflammations, 1 hydrocele). The amelioration of spermogram depends, that the varicocele associated with obstruction or not.

CONCLUSION

The incidence of complications can be reduced by employing microsurgical techniques and on a long term this method proves to be the most successful with infertile men.

**Available in VIDEO Library of European Association of
Urology**

PAPER X

Acta Chirurgica Hungarica

NUMBER 1, 2000

in press

**TESTICULAR BIOPSY HELPING ASSISTED
REPRODUCTION**

TESTICULAR BIOPSY HELPING ASSISTED REPRODUCTION

E. Erdei, É. Magyar*, I. Lellei*, J. Rózsahegyi, A. Laki**, A. Ruzs, Gy. Papp

Semmelweis University, Faculty of Health Sciences, Dept. of Urology and Andrology, Dept. of Pathology*, Dept. of Radiology **

Abstract

The authors have performed testis biopsy on 21 male patients according to the pre-designed protocol. The biopsy has been carried out from scrotal excision, with the exposure of both testis with microsurgical method. The results have been evaluated according to the spermogram groups. Correlation of FSH values and histological appearance of both testis was analyzed. Their method and experiences have been evaluated the effectiveness of assisted reproduction.

Figure 1

Introduction

Evaluation of testicular biopsies for the treatment of male infertility was started in the late 1930-s.

Charny, Hotchiss and Engle have performed the first testicular biopsy. The first papers in this topic (3, 6) were published by them between 1940-42. Testicular biopsy was believed a completely known as examination method. The technique was described and the method was used by everyone interested in male infertility (1, 9, 10, 13).

The basic method in the diagnosis of male infertility is the sperm examination. However it in many cases it gives no information for the spermium producing capacity of the testis, like by azoospermic and gravis oligozoospermic patients. In cases like this testicular biopsy is an essential method. The basic method of histological examination remained unchanged but because of the developing of the science some rules should be reviewed. The role of testicular biopsy was also changed by the development and widespread use of assistant reproduction techniques (15).

It is a well-known phenomenon among the specialists dealing with assisted reproduction that the number of deliveries decreases in many countries, in some countries it has reached the critical level. This tendency is to see in Hungary as well.

With the development of reproduction techniques new methods like micro-assisted methods presented to help human reproduction (14). The most modern technique called ICSI combined with the sperm extraction directly from testicular tissue (TESE, Devroey 1995) has given a new role

improving its importance. It has not only a diagnostic value but a therapeutic as well (17).

Materials and methods

In our institution testicular biopsy was performed by 23 men between 1997 and June 1998. We evaluated 21 of them. The examination of patients followed a prescribed management which included anamnesis, physical examination, sperm analysis, scrotal ultrasound, hormone levels and genetic examination (20).

The distribution of the patients according the spermogram and spermatocytogram are shown in Table 1. The rate of azoospermic and severe oligozoospermic patients visiting our andrology clinic was 38%. In the oligozoospermic group (57%) the sperm concentration was less than 12 million/ml.

Table 1.

Technique of testicular biopsy:

The method used by the authors is a bilateral open surgical biopsy technique. Scrotal exploration is performed with an incision in the line of the raphe. By scrotal exploration the advantages of perioperative diagnostics can be used (5), the turgor and the state of the epididymis can be recorded. Changes which remain hidden for the imaging techniques can also be seen (18). The more accurate grading of varicocele is also possible. By more than the third of the patients the sperm analysis showed severe alterations, so the additional diagnostic information gained by scrotal exploration is extremely useful. Two biopsy samples are taken from both testis usually from the inner upper and lower outer quadrant using atraumatic microsurgery. The pre-designed protocol was changed only if the method described above cannot be carried out. For the testis incision 6/0 atraumatic resorbable suture, for the tunica 5/0 atraumatic resorbable suture is used.

Our previous cooperation studies with foreign andrological centre showed that the spermatogenesis in the testis is inhomogenous, so the multiple biopsies taken from different sites give additional information. The aim of this study is to clarify the differences of the samples taken from different sites and the correlation of the histological appearance and the FSH levels.

Results

Data were evaluated by groups according to the spermogram.

The azoospermic group consisted of 4 patients, all of them with a karyotype of 46 XY. The FSH levels and histology results are summarized in Table 2. The FSH levels ranged between 7,2-24,5 U/l, so there were patients with normal, mildly and severely increased FSH levels. One of the azoospermic patients Sertoli Cell Only Syndrome (SCOS) in all of his 4 samples (see figure 2).

In another case there was no evidence of mature spermatozoa in any sample of one testis, histology showed early maturation arrest. (see figure 3)

In the other testis decreased spermatogenetic activity was present with mixed maturation arrest (12). By the highest FSH level in 3 of the 4 quadrant of the 2 testis there was no mature spermatozoa, but maturation arrest could be seen. In the forth quadrant histology concerned normal spermatogenesis. Table 2 shows the FSH levels and histological appearance of the azoospermic patients. The % value shows that the biopsy sample taken from the actual location howmany % represents the histological picture.

Table 2., Table 3., Table 4.

The number of our severe oligozoospermic patients was also 4. By this patients the sperm concentration was less than 5 million/ml. The karyotype was 46 XY by all of them. Data are shown in Table 3. By two of them all samples showed decreased spermatogenesis with early and late maturation arrest, see figures 3 and 4.

In one case with increased FSH level in one of the 4 biopsies (left testis lower outer quadrant) sufficient spermatogenesis was found without maturation arrest.

The moderate oligozoospermic group consisted of 12 patients. In our cases sperm concentration was less than 12 million/ml (ranged 5-12 million/ml) The FSH level was normal in 11 of the 12 cases. By 8 of the 12 patients normal spermatogenesis was present with no maturation arrest (see figure 5).

The distribution of spermatogenesis was homogenous with an average number of spermatozoa ranged 24-33/tubule. In 4 other cases the spermatogenesis was inhomogenous with a variable amount of spermatozoa/tubule. This value ranged 0-37 and maturation arrest and decreased spermatogenesis was also present (13).

One patient presented with asthenoteratozoospermia with normal sperm count and FSH level. Histology showed normal spermatogenesis with no evidence of maturation arrest (figure 5)

Discussion

Since the introduction of intracytoplasmic sperm injection theoretically one spermatozoa in enough to fertilize th ovum. In azoospermic and severe oligozoospermic patients the fertilizing spermatozoa can be extracted directly from the testis (14, 19). Some authors have reported successful fertilization by round spermatide, most specialists suggest mature elongated spermatozoa for the micromanipulation. There are more criteria to fulfil for the start of the development of a healthy embryo, for the occurrence of biological pregnancy and the delivery of a healthy baby. If these criteria are not fulfilled, only in vitro fecondation occurs after the micromanipulation. The most pricipal criterion is the presence of good quality germ cells from both maternal and paternal side. Spermatozoa need sufficient hormone

levels and stable microenvironment (11) for their development. The sufficient microcirculation of testicular tissue is essential. The state of microcirculation is diagnosed from the testicular biopsy, so surgical correction is an important point of the therapy (2, 20)

Conclusions

Our results and other internationally known authors results confirmed that high FSH level is not a contraindication of testicular biopsy (15, 17). By a high (more than the double of the normal FSH level) at least in one of the 4 samples satisfactory spermatogenesis could be found (5).

Although we have just a low number of cases, our tables show that there is no linear correlation between the increase of the FSH level and the grade of the tubular damage. (see Tables 2 and 3).

In our opinion by infertile males diagnostic testicular biopsy should always be done before the therapeutic one (20). Histology helps to clarify the functional state of the testis. Our and international data suggest that one sample is not enough for the correct evaluation of testicular function.

Multiple diagnostic sampling gives the opportunity to find the optimal site where the therapeutic sample for fertilization should be taken from.

In the examination of couples involved in the fertilization program the histologist plays an important role. Interdisciplinary teamwork improves the effectiveness of his work.

High quality collaboration of the involved specialists is important for the effectiveness of assisted reproduction techniques. But even by the use of the most sophisticated methods we should not forget that successful therapy may only follow an adequate diagnosis.

References

1. Agger P., Johnsen SG: Quantitative evaluation of testicular biopsies in varicocele. *Fertil.Steril*; 29-52, 1974.
2. Arvis G. Varicocele et infertilité. *Progres en urologie* 40-52, 1993
3. Charny CW. Testis biopsy: its value in male sterility. *JAMA* 115: 1429-1432, 1940.
4. Goldstein M.: Surgery of male infertility and other scrotal disorders. In: Walsh PC., Retik AB., Stamey TA., Vaughan ED., eds. *Cambell's Urology*, 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; 3114-3149, 1992.
5. Gottschalk-Sabag S., Weiss D.B., Folb-Zacharow N., Zukerman Z.: Is one testicular specimen sufficient for quantitative evaluation of spermatogenesis? *Fertil.Steri.* Vol.64.,No.2. 399-402.,1995.
6. Hotchkiss RS.: Testicular biopsy in the treatment of sterility in the male. *Bull.Ny. Acad.Med.* 18: 600-605, 1942.
7. Ibrahim A.A., Awad H.A., El-Haggag S., Mitawi B.A.: Bilateral testicular biopsy in men with varicocele. *Fertil .Steril.* vol.28, No.6,663-667,1977.

8. Jarow JP.: Intratesticular arterial anatomy. *J.Androl.*;11:255-259, 1990.
9. Johnsen GS.: Testicular Biopsy Score coun- A Method for Registration of Spermatogenesis in Human Testes: Normal Values and Results in 335 Hypogonadal Males. *Hormones*, vol.1,No.1; 1-24, 1970.
10. Levin HS, Thomas AJ Jr.: Testicular biopsy. *AUA Update Series*. Vol.4.;Lesson13:1-7, 1985.
11. Martin DC, Menck HR.: The undescended testis: management after puberty. *J Urol*;114:77-79, 1975.
12. Martin-du Pan R.C., Campana A.: Physiopathology of spermatogenic arrest. *Ferti.Steri.* vol.60, No.6, 937-944, 1993.
13. Meihard E., McRae CU, Chisholm GD: Testicular biopsy in evaluation of male infertility. *Br.Med.J.*; 3:577-81, 1973.
14. Papp Gy., Rajczy K., Bernárd A., Kopa Zs.: A direkt sebészi spermiumnyerés (SMART) első hazai andrológiai eredményei. *Hungarian Andrology III.*, 3 vol. 89-91, 1998.
15. Silber S.J.,Nagy Z., Devroey P., Tournaye H., Van Steirteghem A.C.: 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.* Vol.12,no.11, 2422-2428, 1997.
16. Skakkebak N.E., Heller C.G: Quantification of human seminiferous epithelium, *J.Reprod. Fert.* 32,379-389,1993.
17. Schoysman R., Cassey M., Lejeune B., Segal L., Roosendaal E., Bertin G., Nijs M., Vandamme B., Vanderzwalmen P.: Renewed interest in testis biopsy in the management of the azoospermic male. *Magyar Andrológia* No.1., 8-12., 1997.
18. Tan KH, Peter H C Lim: Testicular biopsy & scrotal exploration in management of male infertility, *Sing.Med.J.*;32:41-46, 1991
19. Tournaye H., Liu J., Nagy P.Z., Camus M., Goossens A., Silber S, Van Steirteghem A.C., and Devroey P: Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. *Human Repr.*vol.: 11. No 1, pp127-132, 1996.
20. Tritto J., Giargia E., Erdei E, Morlier D. The role of testicular biopsy in microsurgical correction of bilateral varicocele. *AMBER'95*, Paris, Proceedings 274-278, 1995.
21. Yoshida A., Miura K., Shirai M: Evaluation of seminiferous tubule scores obtained through testicular biopsy examinations of nonobstructive azoospermic men. *Fertil. Steril.* Vol.68, no.3. 514-518,1997.
22. Zuckerman Z., Rodriguez-Rigau LJ., Weis DB., Chowdhury LJ., Smitak D., Steinberger E.: Quantitative analysis of the seminiferous epithelium in human testicular biopsies, and the relation of spermatogenesis to sperm density. *Fertil.Steril.*; 30: 448-455, 1978.

Figure 1,

Schematic picture of testis biopsy

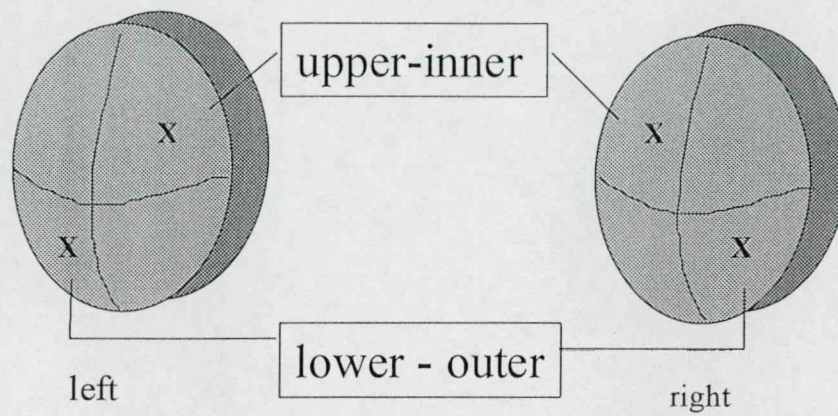


Figure 2.

Sertoli Cell Only Syndrome, haematoxylin-eosin, 300x magnification

Figure 3. Early maturation arrest, haematoxylin-eosin, 300x magnification.

Figure 4. Late maturation arrest, hamatoxylin-eosin, 300x magnification.

Figure 5. Normal spermatogenesis, haematoxylin-eosin, 300x magnification.

Table 1

Distribution according spermogram

group		Number of cases	concentration
I.	Azoospermia	4	0-0,9
II.	Severe oligozoospermia	4	1-4,9
III.	Oligozoospermia	12	5-12
IV.	Astheno-teratozoospermia (with normal sperm count)	1	>20
Total		21	

Table 2

Azoospermic patients, FSH values and histology
 Number of patients:4/21, karyotype 46XY

N	FSH	Histological	Appearance	
	U/l	Left testis	Right testis	Quadrant
1	12,9	removed	34	Upper-inner
3	17,1	SCO 100%	SCO 100%	Upper inner
		SCO 100%	SCO 100%	Lower outer
10	7,2	0 (stc) 100%	7 (std) 30%	Upper inner
		0 (stc) 100%	8 (stc) 5 %	Lower outer
15	24,5	0 (stc) 100%	0 (stc) 100%	Upper inner
		0 (stc) 100%	23 60%	Lower outer

Stc: spermatocyte, std: spermatide

Table 3

Severe oligozoospermic patients, FSH and histology
 Number of patients: 4/21, karyotype 46XY

N	FSH	histological	Appearance	
	U/l	Left testis	Right testis	Quadrant
4	5,9	0 100%	0 100%	Upper inner
		27 (std) 77%	8 10%	Lower outer
9	27,5	0 100%	0 100%	Upper inner
		23 100%	0 (stc) 100%	Lower inner
13	8,5	0 100%	13 84%	Upper inner
		-	37 100%	Lower outer
21	7,8	-	8 (stc) 60%	Upper inner
		-	2 (stc) 35%	Lower outer

Stc: spermatocyte, std: spermatide

Table 4

Oligozoospermic patients, FSH values and histology

Sperm concentration	<12 M/ml
Number of patients	12/21
Normal FSH	11/12
karyotype	12/46 XY
Without maturation arrest	8/12 (2,5,11,16,17,18,19,20) histology: even distribution, sufficient spermatogenesis in all samples (24-33 spermatozoa/tubule)
With maturation arrest	4/12, (6,7,8,14) histology: inhomogenous distribution, spermatozoa/tubule ranged 0-37