

**ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ****ΝΕΕΣ ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΚΑΤΑ Π.Ο.Υ. ΓΙΑ ΤΙΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΗΣ ΒΑΣΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ****Λ. Α. Ευγενή<sup>1</sup>, Γ. Ι. Λυμπερόπουλος<sup>2</sup>****ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΑΝΑΓΚΑΙΟΤΗΤΑ ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΥ ΝΕΩΝ ΤΙΜΩΝ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ**

Η εργαστηριακή αξιολόγηση της ποιότητας του ανδρικού σπέρματος βασίζεται κατά κύριο λόγο στην εκτίμηση των παραμέτρων της Συμβατικής Ανάλυσης (Σπερμοδιαγράμματος), δηλαδή του όγκου σπέρματος, της συγγέντρωσης, της κινητικότητας, της μορφολογίας και της ζωτικότητας των σπερματοζωαρίων. Το «Εγχειρίδιο του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.) για την εξέταση του ανθρώπινου σπέρματος και την αλληλεπίδραση σπέρματος - τραχηλικής βλέννας», με τελευταία έκδοση το 1999, περιγράφει τις καθιερωμένες μεθοδολογίες, σύμφωνα με τις οποίες τα εργαστήρια που ασχολούνται με την ανάλυση σπέρματος οφείλουν, για λόγους τυποποίησης, να διενεργούν τις μετρήσεις των δειγμάτων τους<sup>1</sup>.

Οι «Τιμές Αναφοράς» (Τ.Α.) ή «Φυσιολογικές Τιμές» (Φ.Τ.) που προτείνονται για τις σπερματολογικές παραμέτρους από το εγχειρίδιο και έχουν έως σήμερα επικρατήσει ως διεθνή κριτήρια για το χαρακτηρισμό ενός σπέρματος ως «φυσιολογικού» ή μη, εμφανίζουν περιορισμούς ως προς τη διαγνωστική τους αξία. Το γεγονός αυτό αποτελεί απόρροια του μη επακριβούς καθορισμού των πληθυσμών αναφοράς και της μη απόλυτης συγκρισιμότητας των εφαρμοζόμενων μεθοδολογιών από τα εργαστήρια που πραγματοποίησαν τις μελέτες πάνω στις οποίες βασίστηκε ο καθορισμός των τιμών. Επιπλέον, τα στοιχεία τα οποία συλλέχθηκαν δεν περιλάμβαναν μετρήσεις από δείγματα σπέρματος ανδρών που είχαν επιτύχει πρόσφατες εγκυμοσύνες<sup>2</sup>.

Ως εκ τούτου, κατά τα τελευταία 10 χρόνια χρησιμοποίησης των Φ.Τ. του Π.Ο.Υ. στην αξιολόγηση του ανδρικού παράγοντα υπογονιμότητας, δεν υπήρξε ομοφωνία μεταξύ των επιστημόνων του χώρου για την καταλληλότητά τους ως κριτηρίων διάκρισης για τη δυνητική γονιμοποιητική ικανότητα των εξεταζομένων<sup>3,4</sup>.

Δεδομένης της ευρείας εφαρμογής της Συμβατικής Ανάλυσης Σπέρματος ως μεθόδου πρώτης γραμμής για την αξιολόγηση του ανδρικού παράγοντα, κατέστη εμφανής η αναγκαιότητα για την καθιέρωση νέων ορίων αναφοράς, που θα ξεπερνούν τους περιορισμούς των παλαιότερων κριτηρίων.

Υπό το πρίσμα αυτό, μια ομάδα έγκριτων επιστημόνων της ανθρώπινης αναπαραγωγής, με επικεφαλής τον Trevor G. Cooper, πραγματοποίησαν μια εκτενέστατη μελέτη με σκοπό την εύρεση νέων ορίων αναφοράς για τις βασικές σπερματολογικές παραμέτρους, με ουσιαστική διαγνωστική χρησιμότητα. Η μελέτη διενεργήθηκε με την υποστήριξη του Π.Ο.Υ. και τα αποτελέσματά της πρόκειται να ενσωματωθούν στην επικείμενη 5η έκδοση του «Εγχειριδίου για την εξέταση και επεξεργασία του ανδρικού σπέρματος», που αναμένεται να δημοσιευθεί εντός του 2010.

Σκοπός του παρόντος άρθρου είναι η περιγραφή των βασικότερων σημείων της πρόσφατης δημοσίευσης των Cooper et al στο Human Reproduction Update, προκειμένου να γνωστοποιηθούν στους κλινικούς ιατρούς της Ανθρώπινης Αναπαραγωγής τα νέα δεδομένα για την αξιολόγηση της ποιότητας του ανδρικού σπέρματος, όπως αυτή εκτιμάται μέσα από τη Συμβατική Ανάλυση.

**ΣΧΕΛΙΑΣΜΟΣ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

Πρόκειται για μια εκτενή μετα-ανάλυση πληθυσμιακών μελετών, οι οποίες αφορούσαν συνολικά μετρήσεις δειγμάτων σπέρματος από 4.500 άνδρες σε 14 χώρες 4 ηπείρων. Οι έρευνες που περιελήφθησαν είχαν διενεργηθεί από το 1990 έως και το 2009 από εργαστήρια που εφαρμόζαν τυποποιημένες μεθόδους ανάλυσης σπέρματος, σύμφωνα με την ισχύουσα, για την εποχή κατά την οποία πραγματοποιήθηκαν, έκδοση του εγχειριδίου του Π.Ο.Υ. (1987, 1992, 1999)<sup>1,5,6</sup>. Οι συνδυασμοί δεδομένων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των κατανομών αναφοράς, αφορούσαν μόνο εργαστήρια που συμμετείχαν σε προγράμματα αυστηρού εσωτερικού και εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου.

Πίνακας 1. Βασικές μεθοδολογίες μέτρησης για τις σπερματολογικές παραμέτρους.

Συγκέντρωση	Μέτρηση με αιμοκυτταρόμετρο (κυρίως Neubauer) σε αραιωμένα και μονιμοποιημένα δείγματα
Κινητικότητα	Μέτρηση ολικής κινητικότητας (κατηγορίες $\alpha + \beta + \gamma$ ) κατά Π.Ο.Υ. και προωθητικής κινητικότητας (κατηγορίες $\alpha + \beta$ ) κατά Π.Ο.Υ. <sup>9</sup>
Μορφολογία	Αξιολόγηση με βάση τα αυστηρά κριτήρια κατά Tygerberg <sup>1,6</sup>
Ζωτικότητα	Χρώση ηωσίνης-νιγκροσίνης (για τον πληθυσμό αναφοράς)
Ολικός αριθμός σπερματοζωαρίων	Πολλαπλασιασμός συγκέντρωσης επί τον όγκο του σπέρματος σε κάθε δείγμα ξεχωριστά

Οι πληθυσμοί που μελετήθηκαν ήταν οι εξής:

Άνδρες οι οποίοι είχαν επιτύχει εγκυμοσύνη σε χρονικό διάστημα  $\leq 12$  μηνών ελεύθερων επαφών – πληθυσμός αναφοράς.

Άνδρες μη ελεγμένης γονιμότητας – γενικός πληθυσμός.

Άνδρες οι οποίοι χαρακτηρίζονται ως νορμοζωοσπερμικοί, σύμφωνα με τα τρέχοντα κάθε φορά κριτήρια του Π.Ο.Υ.

Άνδρες γόνιμοι, με μη καθορισμένο χρονικό διάστημα έως την επίτευξη εγκυμοσύνης.

Τα δείγματα σπέρματος που αξιολογήθηκαν είχαν προέλθει από πλήρη συλλογή ενός δείγματος από κάθε εξεταζόμενο<sup>7,8</sup>, κατόπιν διήμερης έως επταήμερης αποχής από εκσπερμάτιση<sup>1</sup>. Οι βασικές μεθοδολογίες μέτρησης για τις παραμέτρους αναφέρονται στον πίνακα 1.

#### ΝΕΕΣ ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι νέες «φυσιολογικές τιμές», όπως καθορίστηκαν από τις μετρήσεις των δειγμάτων του πληθυσμού αναφοράς, διαμορφώνονται στα επίπεδα που αναφέρονται στον πίνακα 2.

Οι τιμές αυτές συνιστούν το 5ο εκατοστημόριο της κατανομής, με διαστήματα εμπιστοσύνης 95%. Τα στοιχεία αυτά καταγράφονται στον πίνακα 2, σε αντιπαραβολή με τις προτεινόμενες τιμές αναφοράς από την 4η έκδοση του εγχειριδίου του Π.Ο.Υ. (1999). Είναι προφανές ότι εκτός του συνολικού αριθμού σπερματοζωαρίων στο εκσπερμάτωμα, οι Τ.Α. για όλες τις βασικές παραμέτρους είναι σημαντικά χαμηλότερες από αυτές που προτείνονται σε όλες τις προηγούμενες εκδόσεις των εγχειριδίων του Π.Ο.Υ.

Μόνο η τιμή του κατώτερου ορίου επιλέχθηκε λόγω της κλινικής της χρησιμότητας<sup>10,11</sup> – τα «ανώτερα» όρια αναφοράς δεν παρέχουν κάποια κλινικά σημαντική πληροφορία στην περίπτωση των παραμέτρων του σπέρματος. Οι ιδιαίτερα υψηλές τιμές προωθητικής κινητικότητας και φυσιολογικής μορφολογίας δεν έχουν συσχετισθεί με αρνητικές επιπτώσεις στη γονιμότητα<sup>12</sup>. Σε ό,τι αφορά τη συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων, η πολυζωοσπερμία (συγκέντρωση  $\geq 250 \times 10^6/\text{ml}$ ) είχε παλαιότερα συσχετισθεί με υπογονιμότητα, λόγω μειωμένων επιπέδων ακροσίνης<sup>13</sup> και δυσλειτουργίας του ακροσώματος<sup>14</sup>, καθώς επίσης και με αυξημένο ποσοστό αντόματων αποβολών. Ωστόσο, η δυσμενής αυτή επίδραση του υψηλού αριθμού σπερματοζωαρίων στη γονιμότητα δεν επιβεβαιώνεται από πρόσφατα δεδομένα<sup>12</sup>.

#### ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η συγκριτική στατιστική θεώρηση των μετρήσεων μεταξύ του πληθυσμού αναφοράς και των υπόλοιπων υπό μελέτη πληθυσμών, κατέδειξε ότι:

Οι άνδρες με χρόνο επίτευξης εγκυμοσύνης μικρότερο των 12 μηνών είχαν υψηλότερο όγκο σπέρματος, συγκέντρωση και φυσιολογική μορφολογία απ' ό,τι οι υπόλοιποι πληθυσμοί.

Τα ποσοστά ολικής και προωθητικής κινητικότητας βρέθηκαν χαμηλότερα στον πληθυσμό αναφοράς απ' ό,τι στους νορμοζωοσπερμικούς και σε όλες τις ομάδες, αντίστοιχα.

Παρά το χαμηλότερο ποσοστό προωθητικής κινητικότητας στον πληθυσμό αναφοράς, ο μεγαλύτερος όγκος σπέρματος και ολικός αριθμός σπερματοζωαρίων που εμφάνιζε, συνέβαλαν στην επίτευξη υψηλότερου συνολικού αριθμού προωθητικών κινούμενων σπερματοζωαρίων σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την παρουσία αυξημένου ποσοστού μορφολογικώς ομαλών σπερματοζωαρίων, καθιστά την ποιότητα του σπέρματος των γόνιμων αυτών ανδρών συνολικά καλύτερη, σε σύγκριση με τους υπόλοιπους υπό εξέταση πληθυσμούς<sup>2</sup>.

Πίνακας 2. Νέες τιμές αναφοράς και ισχύουσες κατά Π.Ο.Υ. (1999) για τις βασικές σπερματολογικές παραμέτρους.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΝΕΕΣ ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (ΜΕ ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ ΕΜΠΙΣΤΟΣΥΝΗΣ 95%)	ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΚΑΤΑ Π.Ο.Υ. (1999)
Όγκος σπέρματος	≥ 1,5ml (1,4-1,7)	≥ 2ml
Συγκέντρωση σπερματοζωαρίων	≥ 15 x 10 <sup>6</sup> /ml (12-16)	≥ 20 x 10 <sup>6</sup> /ml
Ολικός αριθμός σπερματοζωαρίων	≥ 39 x 10 <sup>6</sup> (33-46)	≥ 40 x 10 <sup>6</sup>
Κινητικότητα σπερματοζωαρίων	≥ 32% (31-34) με προωθητική κινητικότητα (κατηγορίες α+β) εντός 60 min από την εκσπερμάτιση	≥ 25% με ταχεία προωθητική κινητικότητα (κατηγορία α) ή ≥ 50% με προωθητική κινητικότητα (κατηγορίες α + β) εντός 60min από την εκσπερμάτιση
Ολική κινητικότητα σπερματοζωαρίων	≥ 40% (38-42) με προωθητική και επιτόπια κινητικότητα (κατηγορίες α+β+γ) εντός 60 min από την εκσπερμάτιση	
Μορφολογία σπερματοζωαρίων	≥ 4% (3-4) κατά Tygerberg	≥ 15% κατά Π.Ο.Υ. ή ≥ 14% κατά Tygerberg και Δείκτης τερατοζωοσπερμίας ≤ 1,6
Ζωτικότητα σπερματοζωαρίων	≥ 58% (55-63) ζώντα (μη κεχρωσμένα)	≥ 75% ζώντα (μη κεχρωσμένα)

#### ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΤΙΜΩΝ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι νέες Τ.Α. έχουν διαμορφωθεί με βάση στοιχεία αυστηρότερα καθορισμένων πληθυσμών ελέγχου απ' ό,τι στο παρελθόν. Στο σημείο αυτό πλεονεκτούν έναντι των προηγούμενων όσον αφορά τη σημασία τους στα πλαίσια της κλινικής αξιολόγησης ενός σπερματολογικού ελέγχου.

Ωστόσο, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων δεν παύει να προϋποθέτει προσοχή. Τα όρια αναφοράς δεν πρέπει να υπερερμηνεύονται ως απόλυτα κριτήρια διάκρισης μεταξύ των γόνιμων και υπογόνιμων ανδρών. Αν και περιγράφουν με ικανοποιητικό τρόπο τα επίπεδα των σπερματολογικών χαρακτηριστικών ανδρών, που έχουν αποδειχθεί γόνιμοι με φυσιολογικό τρόπο σε πρόσφατο χρονικό διάστημα, δεν συνιστούν το μοναδικό κριτήριο που εγγυάται τη γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος. Εξάλλου, εξ ορισμού, ένα 5% των γόνιμων ανδρών από τους οποίους προήλθαν τα δεδομένα, φέρουν τιμές εκτός του διαστήματος εμπιστοσύνης 95%<sup>2</sup>.

Με άλλα λόγια, η αξιολόγηση των τιμών του σπερματοδιαγράμματος εκτός των Τ.Α. δεν σημαίνει απαραίτητα την αδυναμία επίτευξης εγκυμοσύνης. Αντίστροφα, η εκτίμηση του σπερματολογικού προφίλ ενός εξεταζομένου εντός των Τ.Α. δεν αποτελεί εγγύηση για τη γονιμοποιητική του ικανότητα. Παρέχει, ωστόσο, έναν τυποποιημένο κανόνα, σύμφωνα με τον οποίο η πιθανότητα ενός «φυσιολογικού» σπέρματος να είναι και «γόνιμο» εμφανίζεται αυξημένη.

Το γονιμοποιητικό δυναμικό ενός άνδρα οφείλει να αξιολογείται σε συνδυασμό με κλινικές πληροφορίες που αφορούν το σεξουαλικό του ιστορικό, τη λειτουργία των αδένων του γεννητικού του συστήματος, ουρολογικά ή ενδοκρινολογικά ευρήματα, εξειδικευμένες λειτουργικές παραμέτρους, όπως η ακεραιότητα του DNA και η συμπίκνωση της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων, αλλά και γυναικολογικούς παράγοντες<sup>15</sup>. Δεν πρέπει να λησμονείται ότι η υπογονιμότητα αποτελεί μια κατάσταση πολυπαραγοντικού χαρακτήρα, η οποία εκφράζει την αποτυχία ενός ζευγαριού να επιτύχει εγκυμοσύνη εντός ενός καθορισμένου διαστήματος.

Συμπερασματικά, τα επίπεδα των βασικών σπερματικών παραμέτρων ενός άνδρα θα πρέπει να ερμηνεύονται παράλληλα με το κλινικό ιστορικό. Η σύγκριση με τα όρια αναφοράς δειγμάτων που πέτυχαν φυσιολογική σύλληψη μπορεί να χρησιμεύσει ως ενδεικτικό στοιχείο για το αν ένας άνδρας έχει ανάγκη θεραπείας για υπογονιμότητα, χωρίς όμως να καθορίζει τη φύση της θεραπευτικής στρατηγικής<sup>2</sup>.

#### ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Σύμφωνα με την άποψη των επιστημόνων που καθόρισαν τις νέες Τ.Α., είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν περισσότερες έρευνες για την ενίσχυση της εφαρμογής τους σε διεθνή κλίμακα. Προοπτικές μελέτες με σκοπό την ελαχιστοποίηση των μεθοδολογικών αποκλίσεων μεταξύ εργαστηρίων, θα πρέπει να σχεδιαστούν, με έμφαση στον

ποιοτικό έλεγχο. Η εφαρμογή κοινών τεχνικών, η αξιολόγηση μονιμοποιημένων δειγμάτων συγγέντρωσης<sup>16</sup> και μορφολογίας και βιντεοσκοπημένων δειγμάτων κινητικότητας, θα μπορούσε να βοηθήσει προς αυτή την κατεύθυνση<sup>2</sup>.

Επίσης, αν με την πάροδο του χρόνου αποκαλυφθούν γεωγραφικές ή εθνολογικές διαφορές στην αξιολόγηση της γονιμοποιητικής ικανότητας, θα είναι σκόπιμο να πραγματοποιηθούν ειδικές μελέτες σε ξεχωριστούς πληθυσμούς ή περιοχές. Η σύσταση του Π.Ο.Υ. για την προσπάθεια καθορισμού τιμών αναφοράς των σπερματολογικών παραμέτρων σε τοπικό επίπεδο ενισχύεται, υπό την προϋπόθεση ότι το επίπεδο λειτουργίας των εργαστηρίων που θα συμμετάσχουν συνάδει με τα αυστηρά καθορισμένα κριτήρια Διασφάλισης Ποιότητας που εφαρμόζονται διεθνώς.

Μια μελλοντική επιβεβαιωτική μελέτη θα πρέπει να συμπεριλάβει αναφορές από εργαστήρια τα οποία εφαρμόζουν τυποποιημένες μεθόδολογίες, όπως αυτές που θα συμπεριλαμβάνονται στο νέο εγχειρίδιο του Π.Ο.Υ. (5η έκδοση) και θα συμμετέχουν επιτυχώς σε προγράμματα εσωτερικού και εξωτερικού Ποιοτικού Ελέγχου. Τέλος, πολύ ενδιαφέροντα συμπεράσματα είναι δυνατόν να εξαχθούν από την ενσωμάτωση των κριτηρίων για τη συμβατική ανάλυση σπέρματος σε ερευνητικά και κλινικά πρωτόκολλα θεραπευτικής διαχείρισης περιστατικών ανδρικής υπογονιμότητας<sup>2</sup>.

#### BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. World Health Organization. *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction*, 4th edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1999, 128p.
2. Cooper GT, Noonan E, Von Eckardstein S, Auger J, Baker HCG, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT and Vogelsong KM. *World Health Organization reference values for human semen characteristics*. *Hum Reprod Update* [pub Dec 2009:1-15].
3. Bartoov B, Eltes F, Lederman H, Caspi E, Soffer Y. *Estimating fertility potential via semen analysis data*. *Hum Reprod* 1993; 8:65-70.
4. Barratt CL, Naeeni M, Clements S, Cooke ID. *Clinical value of sperm morphology for in vivo fertility: comparison between World Health Organization criteria of 1987 and 1992*. *Hum Reprod* 1995; 10:587-593.
5. World Health Organization. *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction*, 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1987, 80p.
6. World Health Organization. *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction*, 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1992, 107p.
7. Petit Clerc C and Solberg HE. *Approved recommendations (1987) on the theory of reference values*. *Clin Chem Acta* 1987; 170:S3-S12.
8. Solberg HE. *International federation of clinical chemistry, scientific committee, clinical section, expert panel on theory of reference values and international committee for standardization in haematology standing committee on reference values. Approved recommendation (1986) on the theory of reference values. Part I. The concept of reference values*. *Clin Chem Acta* 1987; 165:111-118.
9. Cooper TG and Yeung CH. *Computer-aided evaluation of assessment of 'grade a' spermatozoa by experienced technicians*. *Fertil Steril* 2006; 85:220-224.
10. Horn PS and Pesce AJ. *Reference intervals: an update*. *Clin Chem Acta* 2003; 334:5-23.
11. Solberg HE. *Establishment and use of reference values*. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (eds). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. Philadelphia: Elsevier Inc, 2006:425-448.
12. Tournaye H, Staessen C, Camus M, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A. *No evidence for a decreased fertilizing potential after in vitro fertilization using spermatozoa from polyzoospermic men*. *Hum Reprod* 1997; 12:2183-2185.
13. Schill W-B and Feifel M. *Low acrosin activity in polyzoospermia*. *Andrologia* 1984; 16:589-591.
14. Töpfer-Petersen E, Völcker C, Heissler E, Schill W-B. *Absence of acrosome reaction in polyzoospermia*. *Andrologia* 1987; 19:225-228.
15. Te Velde ER, Eijkemans R, Habbema HD. *Variation in couple fecundity and time to pregnancy, an essential concept in human reproduction*. *Lancet* 2000; 355:1928-1929.
16. Jonckheere K, Callewaert N, Grootenhuis AJ, Kersemaekers WM, Cooper TG. *Feasibility study for the centralized measurement of sperm concentration*. *Int J Androl* 2005; 28:311-315.
17. Auger J, Eustache F, Andersen AG, Irvine DS, Jørgensen N, Skakkebaek NE, Suominen J, Toppaari J, Vierula M, Jouannet P. *Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities*. *Hum Reprod* 2001; 16:2710-2717.
18. Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB, Scheike T, Giwercman A, Olsen J, Skakkebaek NE. *Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners*. *Lancet* 1998; 352:1172-1177.
19. Brady BM, Walton M, Hollow N, Kicman AT, Baird DT, Anderson RA. *Depot testosterone with etonogestrel implants result in induction of azoospermia in all men for long-term contraception*. *Hum Reprod* 2004; 11:2658-2667.
20. Brady BM, Amory J, Perheentupa A, Zitzmann M, Hay C, Apter D, Anderson R, Bremner W, Huhtaniemi I, Nieschlag E et al. *A multi-centre study investigating subcutaneous etonogestrel implants with injectable testosterone decanoate as a potential long-acting male contraceptive*. *Hum Reprod* 2006; 21:285-294.
21. Büchter D, von Eckardstein S, von Eckardstein A, Kamische A, Simoni M, Behre HM, Nieschlag E. *Clinical trial of transdermal testosterone and oral levonorgestrel for male contraception*. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:1244-1249.
22. Gonzalo IT, Swerdloff RS, Nelson AL, Clevenger B, Garcia R, Berman N, Wang C. *Levonorgestrel implants (Norplant II) for male contraception clinical trials: combination with transdermal and injectable testosterone*. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:3562-3572.
23. Gu YQ, Wang XH, Xu D, Peng L, Cheng LF, Huang MK, Huang ZJ, Zhang GY. *A multicenter contraceptive efficacy study of injectable testosterone undecanoate in healthy Chinese men*. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:562-568.
24. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima S, Coutifaris C, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA et al. *Sperm morphology, motility and concentration in fertile and infertile men*. *N Engl J Med* 2001; 345:1388-1393.
25. Haugen TB, Egeland T, Magnus O. *Semen parameters in Norwegian fertile men*. *J Androl* 2006; 27:66-71.

26. Hay CJ, Brady BM, Zitzmann M, Osmanagaoglu K, Pollanen P, Apter D, Wu FC, Anderson RA, Nieschlag E, Devroey P et al. A multicenter phase IIb study of a novel combination of intramuscular androgen (testosterone decanoate) and oral progestogen (etonogestrel) for male hormonal contraception. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:2042-2049.
27. Jensen TK, Slama R, Ducot B, Suominen J, Cawood EH, Andersen AG, Eustache F, Irvine S, Auger S, Jouannet P et al. Regional differences in waiting time to pregnancy among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod* 2001; 16:2697-2704.
28. Jørgensen N, Andresen AG, Eustache F, Irvine DS, Suominen J, Petersen JH, Andersen AN, Auger J, Cawood EH, Horte A et al. Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod* 2001; 16:1012-1019.
29. Kamischke A, Diebäker J, Nieschlag E. Potential of norethisterone enanthate for male contraception: pharmacokinetics and suppression of pituitary and gonadal function. *Clin Endocrinol* 2000a; 53:351-358.
30. Kamischke A, Plöger D, Verherm S, Von Eckardstein S, Von Eckardstein A, Nieschlag E. Intramuscular testosterone undecanoate with or without oral levonorgestrel: a randomized placebo-controlled feasibility study for male contraception. *Clin Endocrinol* 2000b; 53:43-52.
31. Kamischke A, Simoni M, Schrameyer K, Lerchl A, Nieschlag E. Is inhibin B a pharmacodynamic parameter for FSH in normal men? *Eur J Endocrinol* 2001a; 144:629-637.
32. Kamischke A, Venherm S, Plöger D, Von Eckardstein S, Nieschlag E. Intramuscular testosterone undecanoate and norethisterone enanthate in a clinical trial for male contraception. *J Clin Endocrinol Metab* 2001b; 86:303-309.
33. Kamischke A, Heuermann T, Kröger K, von Eckardstein S, Schellschmidt I, Róbig A, Nieschlag E. An effective hormonal male contraceptive using testosterone undecanoate with oral or injectable norethisterone preparations. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:530-539.
34. McLaglan RI, McDonald J, Rushford D, Robertson DM, Garrett C, Baker HW. Efficacy and acceptability of testosterone implants, alone or in combination with 5 $\alpha$ -reductase inhibitor, for male hormonal contraception. *Contraception* 2000; 62:73-78.
35. McLaglan RI, O'Donnell L, Stanton PG, Balourdos G, Frydenberg M, De Kreiser DM, Robertson DM. Effects of testosterone plus medroxyprogesterone acetate on semen quality, reproductive hormones and germ cell populations in normal young men. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:546-556.
36. Meriggiola MC, Bremner WJ, Paulsen CA, Valdiserri A, Incorvaia L, Motta R, Pavani A, Capelli M, Flamigni C. A combined regimen of cyproterone acetate and testosterone enanthate as a potentially highly effective male contraceptive. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3018-3023.
37. Meriggiola MC, Constantino A, Cerpolini S, Bremner WJ, Huebler D, Morselli-Labate AM, Kirsch B, Bertaccini A, Pelusi C, Pelusi G. Testosterone undecanoate maintains spermatogenic suppression induced by cyproterone acetate plus testosterone undecanoate in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:5818-5826.
38. Meriggiola MC, Constantino A, Saad F, D'Emidio L, Labate AM, Bertaccini A, Bremner W, Rudolph I, Ernst M, Kirsch B et al. Norethisterone enanthate plus testosterone undecanoate for male contraception: effects of various injection intervals on spermatogenesis, reproductive hormones, testis and prostate. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:2005-2014.
39. Qoubaitary A, Meriggiola C, Ng CM, Lumberras L, Cerpolini S, Pelusi G, Christensen PD, Hull L, Swerdloff RS, Wang C. Pharmacokinetics of testosterone undecanoate injected alone or in combination with norethisterone enanthate in healthy men. *J Androl* 2006; 27:853-867.
40. Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen TK, Jørgensen N, Horte A, Irvine S, Suominen J, Andersen AG, Auger J et al. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod* 2002; 17:503-515.
41. Steward TM, Liu DY, Garrett C, Jørgensen N, Brown EH, Baker HWG. Associations between andrological measures, hormones and semen quality in fertile Australian men: inverse relationship between obesity and sperm output. *Hum Reprod* 2009; 24:1561-1568.
42. Swan SH, Brazil C, Drobnis EZ, Liu F, Kruse RL, Hatch M, Redmon JB, Wang C, Overstreet JW. Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males. *Environ Health Perspect* 2003; 111:414-420.
43. Turner L, Conway AJ, Jimenez M, Liu PY, Forbes E, McLaglan RI, Handelsman DJ. Contraceptive efficacy of a depot progestin and androgen combination in men. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:4659-4667.
44. Von Eckardstein S, Noe G, Brache V, Nieschlag E, Croxatto H, Alvarez F, Moo-Young A, Sivin I, Kumar N, Small M et al. International Committee for Contraception Research. The Population Council. A clinical trial of 7  $\alpha$ -methyl-19-nortestosterone implants for possible use as a long-lasting contraceptive for men. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:5232-5239.
45. Walton MJ, Kumar N, Baird DT, Ludlow H, Anderson RA. 7 $\alpha$ -methyl-19-nortestosterone (MENT) vs testosterone in combination etonogestrel implants for spermatogenic suppression in normal men. *J Androl* 2007; 28:679-688.
46. Wang C, Wang XH, Nelson AL, Lee KK, Cui YG, Tong JS, Berman N, Lumberras L, Leung A, Hull L et al. Levonorgestrel implants enhanced the suppression of spermatogenesis by testosterone implants: comparison between Chinese and non-Chinese men. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:460-470.
47. World Health Organization. Task Force on Methods for the Regulation of Male Fertility. Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia in normal men. *Lancet* 1990; 336:955-959.
48. World Health Organization. Task Force on Methods for the Regulation of Male Fertility. Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia and oligozoospermia in normal men. *Fertil Steril* 1996; 65:821-829.

<sup>1</sup>M. Phil, Εργαστήριο Σπερματολογίας Γ. Λυμπερόπουλος

<sup>2</sup>Ph. D, Εργαστήριο Σπερματολογίας Γ. Λυμπερόπουλος